N° d'ordre : 105-2006 Année 2006

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT
mention Neurosciences

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 30 juin 2006

par

Romain GOUTAGNY

ETUDE DES RESEAUX NEURONAUX RESPONSABLES DE LA REGULATION DU SOMMEIL PARADOXAL :

Approche pluridisciplinaire chez le rongeur.

Thèse réalisée sous la direction des Dr. Patrice FORT et Pierre-Hervé LUPPI
CNRS UMR5167, Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil,
LYON

Membres du jury:	Pr. Luc ZIMMER	Président
	Dr. Joëlle ADRIEN	Rapporteur
	Dr. Luis VILLANUEVA	Rapporteur
	Dr. Patrice FORT	Examinateur
	Dr. Pierre-Hervé LUPPI	Directeur de thèse

Je remercie très sincèrement :

Monsieur le Professeur Luc Zimmer, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, de s'être « plongé » dans les réseaux neuronaux régulant le sommeil paradoxal et d'avoir pris le temps d'examiner ce manuscrit avec attention et bienveillance.

Madame le Docteur Joëlle Adrien et **Monsieur le Docteur Luis Villanueva**, pour avoir bien voulu accepter d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je les remercie pour leur gentillesse et leur disponibilité. Je les remercie également pour le grand intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Monsieur le Docteur Patrice Fort, pour son scepticisme éclairé, pour m'avoir suivi et encouragé durant ces cinq années passées au laboratoire. Si ce travail de thèse a pu être mené à son terme, c'est en grande partie grâce à sa gentillesse et à sa bienveillance. Qu'il trouve dans ce manuscrit l'expression de mon plus profond respect.

Monsieur le Docteur Pierre-Hervé Luppi, pour m'avoir accepté au sein de son équipe tout d'abord puis de son laboratoire. Je le remercie sincèrement pour sa gentillesse, son enthousiasme et la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces cinq années de travail.

Un grand merci,

A **Denise Salvert**, ce fut un plaisir et un honneur de travailler avec elle durant ces trois dernières années. Qu'elle trouve dans ce manuscrit l'expression de ma très sincère amitié. J'espère vraiment que nous pourrons de nouveau travailler ensemble dans quelques années…

A **Valérie Charlon**, pour sa gentillesse et son humour, pour m'avoir si souvent simplifié la vie avec tous les tracas administratifs et bien sûr pour son sourire de tous les jours….

A **Romuald Boissard**, pour m'avoir appris le modèle du rat vigile, pour sa gentillesse et pour toute l'aide qu'il m'a apportée au début de ce travail.

A **Damien Gervasoni**, pour son aide dans l'écriture de ce manuscrit, pour sa disponibilité (même à l'autre bout du monde) et sa rigueur.

A **Lucienne Léger**, **Christelle Peyron**, **Nadine Gay** pour leur gentillesse et leur bonne humeur quotidienne. A **Céline Scotté**, bon courage pour ta nouvelle vie (un mariage, un nouveau travail…). A **Paul Salin** pour ses conseils avisés en électrophysiologie.

A tous mes compères étudiants, **Pascal** et **Bastien**, pour avoir partagé un bureau rempli de bonne humeur, **Yazid**, pour ses chansons de Whitney Houston, **Damien**, pour cette année fatigante mais au combien enrichissante partagée autour du même poste de manip, **Rosanna** pour son accent si dépaysant, à **Antoine**, dit « le Belge » pour nos soirées arrosées et pour les bonnes bières belges que nous partagions, A **Lucie**, la reine de l'informatique, bientôt ingénieure informaticienne, A **Emilie**, pour ses cheveux roses et sa bonne humeur…. A tous ceux que j'oublie dans ce texte, mais pas dans le cœur…

A mes amis et ma famille,

A **Carlou** et **Lotus**, pour nos années universitaires arrosées, pour avoir su être patient quand le travail était trop présent, et pour avoir su me rappeler qu'il existait une vie en dehors du labo.

A **Seb** et **Toto**, pour cette amitié de plus de 10 ans, pour avoir toujours été là tout au long de ces années.

A mes amis « boulets » **Laure**, **Nico** et **Lio**, pour m'avoir conduit, moi le petit, au bout de ce long chemin qu'est une thèse, pour nos apéros du vendredi à la graine…. Nous voilà maintenant au quatre coins du monde, mais nul doute que cette amitié restera à jamais.

A ma famille, pour avoir cru en moi, pour m'avoir toujours soutenu tout au long des ces années d'études, Merci à tous, **papa**, **maman**, **Gilles**, bien entendu et tous mes petits frères et sœurs, **Sabine** et **Némo**, pour nos repas du jeudi, **Maxime**, courage pour la suite, je sais que tu seras un grand ingénieur, et chose plus importante, vraiment quelqu'un de bien, à **Toto** et **Laureen**, vous voilà grands maintenant, à vous la fac et les soirées étudiantes, profitez-en bien…

A Ma **grand-mère**, partie trop tôt, j'espère que tu es fière de moi où que tu sois….

Et enfin, à **Karol**, pour son amour et son soutien constant. Si cette thèse existe, c'est en très grande partie grâce à toi. Merci de m'avoir fait grandir, d'avoir accepté un mari qui passe ses week-ends au laboratoire pour aller s'occuper de rats. Merci tout simplement d'avoir cru en moi… Notre famille s'agrandit maintenant et ce manuscrit vous est dédié à vous deux, les deux femmes de ma vie. Avec tout mon amour…

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE **1**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **5**

PHENOMENOLOGIE DES ETATS DE VIGILANCE **7**

I. L'EVEIL 7
II. LE SOMMEIL LENT 8
III. LE SOMMEIL PARADOXAL 8
ROLES DU SOMMEIL PARADOXAL **11**
I. LE SP ET LE REVE 11
II. ROLE DU SP DANS LA MATURATION CEREBRALE 12
IV. ROLE DU SP DANS L'APPRENTISSAGE 13
III. ROLE DU SP DANS LA NEUROGENESE 14
V. ROLE DU SP DANS LA CONSERVATION DES COMPORTEMENTS INNES 14
VI. CONCLUSION 16

STRUCTURES ET MECANISMES DE REGULATION DE L'EVEIL. **17**

I. LE SYSTEME NORADRENERGIQUE DU LOCUS CŒRULEUS 18
A – Anatomie 18
B –Physiologie 20
II. LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE DU NOYAU DU RAPHE DORSAL 23
A – Anatomie 23
B – Physiologie 24
III. LE SYSTEME CHOLINERGIQUE DU TEGMENTUM PONTO-MESENCEPHALIQUE 26
A – Anatomie 26
B – Physiologie 27
IV. LE TELENCEPHALE BASAL 27
A – Anatomie 28
B – Physiologie 28
V. LE SYSTEME HISTAMINERGIQUE DU NOYAU TUBEROMAMMILLAIRE 29
A – Anatomie 29
B – Physiologie 30
VI. LE SYSTEME HYPOCRETINERGIQUE DE L'HYPOTHALAMUS POSTERIEUR 32
A – Anatomie 32

B – Physiologie 35
VII. CONCLUSION 39

STRUCTURES ET MECANISMES DE REGULATION DU SOMMEIL LENT **41**

I. LA REGION PREOPTIQUE 41
II. LE NOYAU RETICULE THALAMIQUE ET LES INTERACTIONS THALAMO-CORTICALES 45
III. CONCLUSION 47
STRUCTURES ET MECANISMES DE REGULATION DU SOMMEIL PARADOXAL **49**
I. LE NOYAU SUBLATERO-DORSAL 50
A – Anatomie 50
B – Physiologie 50
II. LES NOYAUX GIGANTOCELLULAIRES DU BULBE RACHIDIEN 53
III. NOYAUX PARAGIGANTOCELLULAIRES DU BULBE RACHIDIEN 54
IV. LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUEDUCALE 55
V. LE SYSTEME CHOLINERGIQUE DU TEGMENTUM PONTO-MESENCEPHALIQUE 57
VI. LES NEURONES DE L'HYPOTHALAMUS POSTERIEUR 57
VII. CONCLUSION 59

MODELISATION DES RESEAUX DU SOMMEIL PARADOXAL **61**

STRATEGIES EXPERIMENTALES **65**

MATERIEL ET METHODES **71**

ENREGISTREMENTS POLYGRAPHIQUES **73**

I. RAPPELS THEORIQUES 73
II. MISE EN ŒUVRE 74

LES SOURIS INVALIDEES POUR DIFFERENTS RECEPTEURS MUSCARINIQUES **77**

I. LES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE RECEPTEURS MUSCARINIQUES 77
II. OBTENTION DE SOURIS GENETIQUEMENT MODIFIEES 79
A - Pourquoi invalider un gène ? 79
B - Comment fait-on pour invalider un gène ? 79
C - Intérêt des homozygotes 80
D - Obtention des différentes souches de souris utilisées dans notre étude 81

- **Souris invalidées pour le récepteur M_2** 81
- **Souris invalidées pour le récepteur M_4** 82
- **Souris invalidées pour les récepteurs M_2 et M_4** 82
- **Souris invalidées pour le récepteur M_3** 83

III. APPORT DES SOURIS KO POUR L'ETUDE DU CYCLE VEILLE-SOMMEIL 83

IV. MISE EN ŒUVRE 85

A - Implantation des animaux 85

B – Enregistrements polysomnographiques et analyse du sommeil 86

C – Analyse spectrale de l'EEG 86

LE MODELE DU RAT VIGILE EN CONTENTION **89**

I. LE SYSTEME DE CONTENTION 89

A –Présentation du système de contention 89

B –Pertinence du modèle pour l'étude du cycle veille-sommeil 90

II. PREPARATION DES ANIMAUX POUR LA CONTENTION 92

A –Implantation des animaux 92

- **Protocole général d'implantation** 92
- **Implantation pour l'enregistrement de l'hypothalamus postérieur** 93
- **Implantation pour l'enregistrement du DPGi** 93

B - Habituation à la contention 93

III - DEROULEMENT DES SESSIONS D'ENREGISTREMENT 95

ENREGISTREMENTS EXTRACELLULAIRES UNITAIRES **97**

I. CONSIDERATIONS TECHNIQUES 97

II. MISE EN ŒUVRE 97

PHARMACOLOGIE LOCALE PAR MICRO-IONTOPHORESE **99**

I. CONSIDERATIONS TECHNIQUES 99

II. MISE EN ŒUVRE 100

A - Fabrication des pipettes 100

B - Préparation des solutions 101

LES TECHNIQUES DE TRAÇAGE DE VOIES **103**

I. LE TRAÇAGE RETROGRADE DE VOIES NERVEUSES 103

A - Principes du traçage rétrograde de voies nerveuses 103

B - La sous-unité B de la toxine cholérique 103
C – Le Fluorogold 104
II. LE TRAÇAGE ANTEROGRADE DE VOIES NERVEUSES 105
A - Principes du traçage antérograde de voies nerveuses 105
B - La leucoagglutinine du Phaseolus vulgaris 105
III. MISE EN ŒUVRE 106

PRIVATION ET REBOND DE SP **107**

L'UTILISATION D'UN MARQUEUR FONCTIONNEL : LA PROTEINE FOS **109**

I. INTERET DES MARQUEURS FONCTIONNELS 109
II. MECANISMES DE SYNTHESE DE LA PROTEINE FOS 109
III. C-FOS ET CYCLE VEILLE-SOMMEIL 110

PERFUSION ET PREPARATION HISTOLOGIQUE **113**

I. PERFUSION 113
II. REALISATION ET CONSERVATION DES COUPES HISTOLOGIQUES 113
III. IMMUNOHISTOCHIMIE 113
A - Principe 113
B - Protocole expérimental général 115

ANALYSE DES DONNEES EXPERIMENTALES **117**

I. DONNEES POLYSOMNOGRAPHIQUES 117
II. DONNEES ELECTROPHYSIOLOGIQUES 117
III. DONNEES PHARMACOLOGIQUES 117
IV. HISTOLOGIE 118

CHAPITRE 1 : **119**

REGULATION CHOLINERGIQUE DU SOMMEIL PARADOXAL CHEZ LA SOURIS **119**

INTRODUCTION **121**

ARTICLE 1: PARADOXICAL SLEEP IN MICE LACKING M_3 AND M_2/M_4 MUSCARINIC RECEPTORS **123**

LE SOMMEIL CHEZ LES SOURIS M_2-/- ET M_4-/- 131

DISCUSSION ET CONCLUSION 135

CHAPITRE 2 : 139

ROLE DES NEURONES DE L'HYPOTHALAMUS POSTERIEUR DANS LA REGULATION DU SOMMEIL PARADOXAL 139

INTRODUCTION 141

ARTICLE2: A ROLE OF MELANIN-CONCENTRATING HORMONE PRODUCING NEURONS IN THE CENTRAL REGULATION OF PARADOXICAL SLEEP 143

DISCUSSION ET CONCLUSION 153

CHAPITRE 3 : 157

REGULATION GABAERGIQUE DES NEURONES A MCH AU COURS DU CYCLE VEILLE-SOMMEIL 157

INTRODUCTION 159

ARTICLE3: GABERGIQUE CONTROL OF HYPOTHALAMIC MELANIN-CONCNTRATING HORMONE-CONTAINING NEURONS ACROSS THE SLEEP-WAKING CYCLE 161

COMPLEMENTS SUR L'ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE 167

I. LES NEURONES SP-ON 167
II. LES NEURONES EV-ON 169
III. LES NEURONES EV-SP 170
V. REPRESENTATION DE L'ENSEMBLE DES NEURONES ENREGISTRES 171

COMPLEMENTS SUR L'ETUDE PHARMACOLOGIQUE 173

MISE AU POINT DU MARQUAGE JUXTACELLULAIRE 177

I. MISE EN ŒUVRE 177
II. RESULTATS SUR L'ANIMAL ANESTHESIE 179
III. RESULTATS SUR L'ANIMAL VIGILE 179

DISCUSSION ET CONCLUSION **183**

I. DONNEES ELECTROPHYSIOLOGIQUES 183
A – Les neurones EV-on 183
B – Les neurones SP-on 184
II. DONNEES PHARMACOLOGIQUES 185

CHAPITRE 4 : **189**

ROLE DU NOYAU RETICULE PARAGIGANTOCELLULAIRE DORSAL DANS LA REGULATION DU SOMMEIL PARADOXAL **189**

INTRODUCTION **191**

ANALYSE DES RESULTATS ELECTROPHYSIOLOGIQUES **195**

RESULTATS EXPERIMENTAUX **197**

I. ELECTROPHYSIOLOGIE 197
A - Mise en place de l'enregistrement électrophysiologique du DPGi 197
B - Activité spontanée des neurones du DPGi au cours du cycle veille-sommeil 197
C - Mode de décharge des neurones SP-on du DPGi 199
II. NEUROANATOMIE 203
A – Traçage antérograde 203
B – Traçage rétrograde 207
Localisation des neurones Fg+. 207
Localisation des neurones Fg/C-Fos après privation. 213
Localisation des neurones Fg/C-Fos après rebond. 213
215

DISCUSSION **217**

I. ELECTROPHYSIOLOGIE 217

II. NEUROANATOMIE 218
A – Traçage antérograde 218
B – Traçage rétrograde 221
Neurones potentiellement impliqués dans l'inhibition des neurones SP-on du DPGi durant l'EV et le SL. 223
Neurones potentiellement impliqués dans l'activation des neurones SP-on du DPGi durant le SP. 223

CONCLUSION **227**

DISCUSSION GENERALE **229**

RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS **231**

INTERPRETATION FONCTIONNELLE **233**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **241**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **243**

Introduction générale

Dans la mythologie grecque, Hypnos, le dieu du sommeil, est le frère de Thanatos, le dieu de la mort. Cette parenté mythique n'est pas un hasard, car on a longtemps cru que pendant le sommeil, le cerveau était pratiquement aussi inactif que celui d'un mort. Ainsi, pendant des millénaires, le sommeil a été décrit comme un phénomène purement passif, résultant d'une diminution progressive de la vigilance. Rien n'était connu quant à sa fonction, sinon celle du bon sens populaire lui attribuant un rôle de récupération physique et psychique suivant les efforts accumulés durant l'éveil.

Il a fallu attendre la fin des années 1950, et la mise en évidence de périodes d'activation corticale au cours du sommeil profond pour conduire à une totale remise en cause de cette interprétation. En effet, chez l'Homme (Aserinsky et Kleitman 1953), puis chez le chat (Jouvet et coll. 1959), les enregistrements polygraphiques ont permis d'observer la survenue périodique, durant le sommeil, d'un troisième état de vigilance, que Jouvet a appelé sommeil paradoxal (SP) et qui est le siège de l'activité onirique (Dement et Kleitman 1957). Dans sa description originelle, le SP se caractérise par une activité cérébrale rapide et désynchronisée semblable à celle de l'éveil, associée paradoxalement à un relâchement musculaire complet (atonie).

Si le sommeil conventionnel appelé depuis sommeil lent (SL) semble avoir principalement une fonction de récupération, que dire alors du SP ? Quelle nécessité a poussé l'évolution à dissocier le sommeil en deux états que tout semble opposer ? Si pour certains, l'apparition du SP chez les homéothermes est liée au développement du cerveau, pour d'autres, c'est la perte de certaines capacités chez les homéothermes (comme la neurogenèse) qui nécessiterait la création d'un nouveau système de programmation génétique, fonction alors assurée par le sommeil paradoxal.

Pourquoi et comment rêvons-nous ? Plus de 50 ans de recherche ont tenté de répondre à cette question. Mais, même si nos connaissances fondamentales se sont considérablement accrues depuis la caractérisation physiologique de ce troisième état de conscience par Michel Jouvet, il nous reste toujours à assembler les pièces du puzzle pour mieux appréhender son fonctionnement, sa régulation et enfin aborder la question de ses fonctions physiologiques et/ou cognitives. Alors que quelques équipes de recherche abordent depuis quelques années l'étude des fonctions du SP chez l'animal mais aussi chez l'homme, nous considérons qu'il est également indispensable de comprendre les mécanismes neurobiologiques et de décrire les réseaux neuronaux complexes responsables du déclenchement et du maintien de cet état de sommeil. C'est dans ce contexte de recherches fondamentales et mécanistiques que se sont inscrits nos travaux décrits dans la suite de ce manuscrit.

Rappels bibliographiques

Phénoménologie des états de vigilance

L'avènement de l'électroencéphalographie (EEG) a marqué le début de l'histoire moderne de la recherche sur le cycle veille sommeil. En effet, grâce à cet outil et aux travaux de Berger sur l'activité électrique du cerveau humain (Berger 1929), les rythmes corticaux de sujets éveillés ou endormis ont pu être enregistrés. Plus tard, l'application de cette technique chez l'animal a permis de distinguer sans ambiguïté les différents états de vigilance à l'aide de critères objectifs (Tudor et coll. 2005). Les enregistrements de l'activité musculaire (électromyogramme, EMG) et des mouvements oculaires (électrooculogramme, EOG) associés à l'EEG ont permis de définir précisément trois états de vigilance: l'éveil, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP), appelé également "sommeil du rêve" puisqu'il est le siège de la plus grande partie de l'activité onirique (Dement et Kleitman 1957; Jouvet et coll., 1959). Selon les espèces, il est possible de subdiviser le SL en plusieurs stades selon la profondeur du sommeil. Ainsi chez le chat sont décrits deux stades de SL (stade I et stade II) alors que chez l'homme, quatre stades sont classiquement différenciés (I à IV). Chez le rat, notre modèle expérimental, seul un stade de SL est généralement décrit (Timo-Iaria et coll. 1970), même si une classification plus complexe basée sur des critères électroencéphalographiques et comportementaux a été décrite (Gottesmann 1992). Ci-dessous sont décrits les critères comportementaux et polygraphiques permettant de distinguer les différents états de sommeil et d'éveil chez le rat (figure 1).

I. L'éveil

Le rat adulte en laboratoire est éveillé en moyenne 60% du temps lors de la période d'obscurité et 30% du temps lors de la période d'éclairement. Au cours de cet état, l'animal est réactif aux stimuli de l'environnement. Comportementalement, il peut être engagé dans une activité motrice ou être immobile et garder les yeux ouverts (éveil calme). L'EEG se caractérise par une activité électrique dite activée ou désynchronisée, c'est-à-dire de bas voltage et de haute fréquence. Elle est essentiellement constituée d'ondes rapides de type β (20-30 Hz) et γ (30-60 Hz). Des ondes θ peuvent être enregistrées au niveau de l'hippocampe lors de l'éveil attentif et lors de l'éveil calme (Vanderwolf 1969). Ce rythme θ peut ainsi passer de 5-6,5 Hz lors de l'EV calme à environ 7,5 Hz lors de l'EV actif ou lors d'un EV

attentif (lorsque le rat est placé face à un défi comportemental par exemple) (Vyazovskiy et Tobler 2005). L'activité motrice que l'animal présente au cours de l'éveil se traduit par un EMG dont l'amplitude varie selon la locomotion et les contractions des muscles enregistrés. De nombreux mouvements oculaires sont enregistrés sur l'EOG. Enfin, le rythme cardiaque est élevé et la respiration rapide.

II. Le sommeil lent

Ce stade occupe 60% de la période d'éclairement et 35% de la période d'obscurité. Au cours du SL, l'animal est immobile, les yeux fermés et moins réceptif aux stimuli extérieurs.
L'animal adopte alors une posture caractéristique "en boule", la tête repliée sous le corps. Le SL se caractérise par une activité corticale dite synchronisée. L'EEG est de haut voltage et de basse fréquence. Les ondes δ (0.5 à 4 Hz) prédominent et des fuseaux (10 à 14 Hz) se superposent.
Le tonus musculaire est fortement diminué, voire absent. Les températures cérébrale et corporelle diminuent, ainsi que la fréquence des rythmes cardiaque et respiratoire.

III. Le sommeil Paradoxal

Chez le rat adulte, le SP occupe environ 10% de la période d'éclairement et 5% de la période d'obscurité. Chez l'animal sain, ce stade apparaît toujours après une phase de SL, sans changement notable de la posture caractéristique du SL. Les enregistrements polygraphiques permettent de distinguer au cours de ce stade des phénomènes toniques et phasiques.
Les phénomènes toniques se caractérisent par un EEG semblable à celui de l'éveil avec cependant une activité plus ample et plus soutenue des ondes θ. Une atonie musculaire complète s'associe paradoxalement à cette intense activité corticale, d'où la dénomination de sommeil paradoxal donnée par Michel Jouvet. Au cours du SP, le rythme cardiaque ralentit tandis que la respiration devient irrégulière.
Les phénomènes phasiques, survenant de façon aléatoire et discontinue, sont constitués par des secousses des muscles des extrémités de la face (vibrisses, oreilles) et des membres, ainsi que des mouvements rapides des globes oculaires. Les anglo-saxons désignent également ce stade par "rapid eye movement sleep" (REM-sleep) du fait de l'apparition ponctuelle de ces

saccades oculaires à haute fréquence. Récemment, la survenue d'érections péniennes apparaissant de façon aléatoire au cours du SP a été démontrée chez le rat (Schmidt 2000).

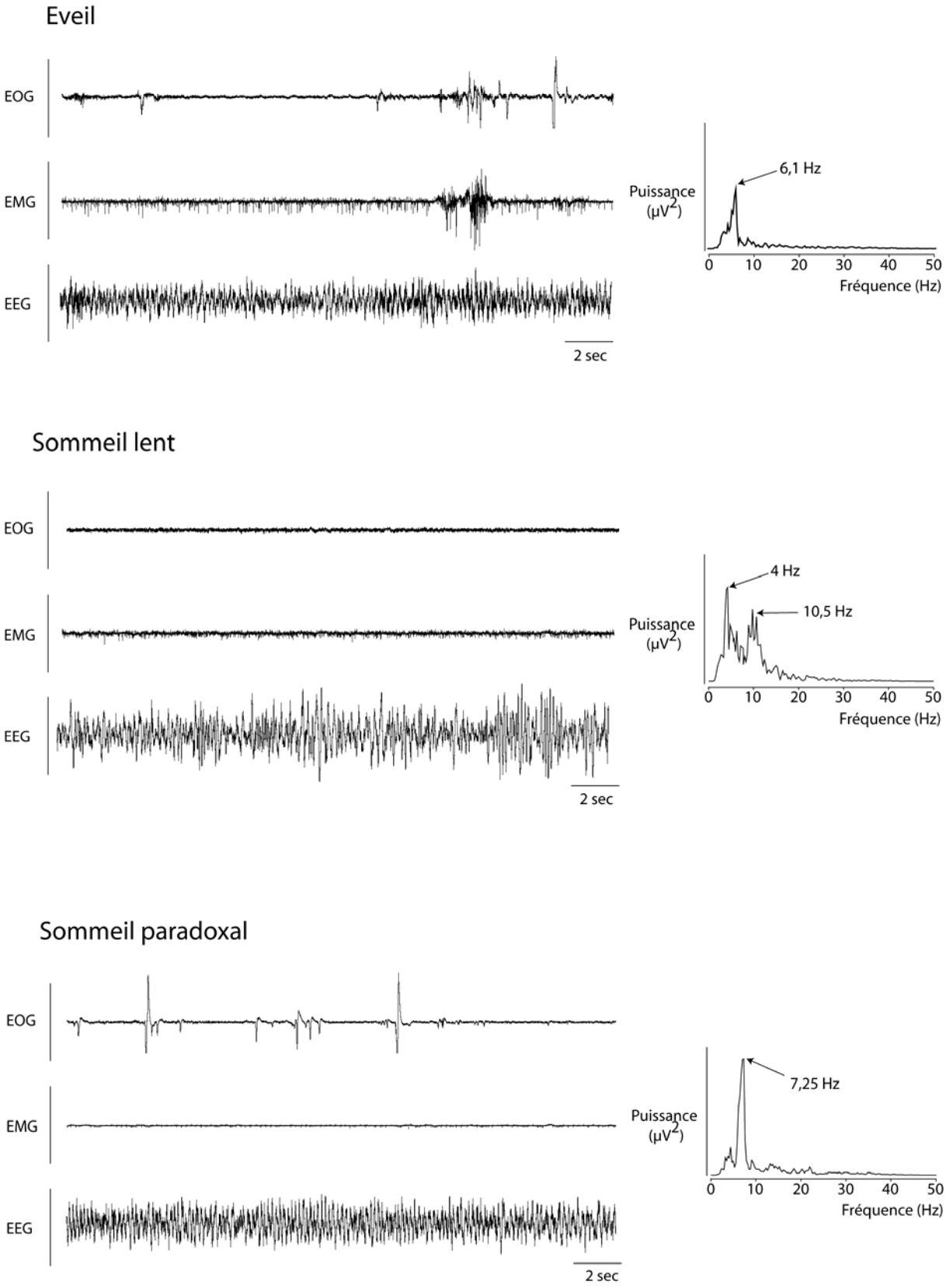


Figure 1 : Enregistrements polygraphiques et décomposition spectrale de l'EEG lors des différents états de vigilance chez le rat.

Rôles du sommeil paradoxal

La découverte de ce troisième état de vigilance qu'est le sommeil paradoxal chez l'homme et les mammifères a conduit à l'émergence de nombreuses questions. Quels sont les rôles du SP ? Pourquoi notre cerveau (comme celui de l'ensemble des homéothermes) consommerait des quantités de glucose et d'oxygène telles qu'elles peuvent dépasser les valeurs de l'éveil alors que dans le même temps, nous sommes complètement coupés de notre environnement ? Cet état de conscience particulier doit ainsi participer à l'élaboration d'une fonction vitale pour notre organisme, sinon, pourquoi sa privation totale chez le rat entraînerait la mort de l'animal en 15 à 20 jours ? (Pour revue, voir (Rechtschaffen et coll. 1989).

Malgré plus de quarante années de recherche sur ce sujet, il n'existe actuellement pas de réponse claire. Cependant, nombre d'hypothèses (plus ou moins scientifiques) ont vu le jour, et nous en décrirons quelques unes dans ce chapitre.

I. Le SP et le rêve

Dès le début des années 1950, Aserinsky, Dement et Kleitman associe le REM sleep à l'activité onirique (Aserinsky et Kleitman 1953 ; Dement et Kleitman 1957). En effet, le réveil des sujets durant ce stade permet d'obtenir avec beaucoup de précision des souvenirs de rêves (dans 80% des cas) alors que ceux-ci sont moins fréquents lorsque le réveil a lieu en dehors de ces phases (environ 7% des cas).

D'autres arguments confortent le lien entre SP et activité onirique (Revue dans (Jouvet 1979)):

- L'analyse fine des souvenirs obtenus lors de réveils forcés au cours du SL ou du SP montre que les rêves surviennent au cours du SP.
- Le rêve dit lucide survient exclusivement au cours du SP…

L'ensemble de ces données semble donc lier fortement rêve et SP. Mais que nous apprennent les rêves sur le rôle du SP ? D´après Robert (1886), «le rêve est l'élimination de pensées étouffées dans l'œuf» : on ne peut évacuer les impressions informes et les pensées non élaborées, sources de tension psychique, qu'en les complétant par des emprunts à l'imagination. On retrouve cette idée dans la théorie de Crick et Mitchison (1983), pour

laquelle le rêve est un processus d'oubli : isolé pendant le sommeil paradoxal, le réseau neuronal serait purgé des informations parasites.

Selon la théorie psychanalytique de Freud, l'homme forme des désirs et des pulsions qui, inacceptables pour la conscience, sont refoulés par celle-ci. Ainsi, l'incohérence apparente du rêve serait expliquée par une censure des désirs refoulés. Cependant, la théorie psychanalytique du rêve a évolué au cours de ces 10 dernieres années pour devenir une représentation fidèle de l'inconscient (Pour revue, voir (Eiser 2005).

Les études d'imagerie fonctionnelle ont apportées recemment un substrat anatomique au rêve. Ainsi, Maquet et coll. (2000) ont montré que les aires cérébrales activées lors d'un apprentissage étaient réactivées lors du sommeil paradoxal. Pour Mazzarello (2000), ces données suggèrent que le rêve servirait à la consolidation des apprentissages effectués durant l'EV, cette « trace mnésique » ne devenant consciente qu'à travers les souvenirs de rêves.

Cependant, aucune théorie n'a trouvé aujourd'hui de support expérimental solide. En particulier, les expériences de privation de sommeil paradoxal, qui perturbent le déroulement normal du sommeil, ne semblent pas entraîner de troubles caractéristiques. Même si la question d'une fonction biologique des rêves reste entierement ouverte, il est intéressant de mesurer le chemin parcouru depuis le début du XXe siècle et la définition du rêve donnée en 1924, par le Larousse Médical Illustré: *« Désordre psychique à contenu absurde et sans valeur pratique ».*

II. Rôle du SP dans la maturation cérébrale

Le fait que le SP soit apparu tardivement au cours de la phylogenèse alors qu'il est présent tôt dans l'ontogenèse des mammifères semble porter plus loin encore le pourquoi de son apparition. En effet, chez les mammifères, et probablement aussi chez les oiseaux, la quantité de SP est étroitement liée au niveau de maturation du système nerveux central. Ainsi, le raton et le chaton, qui naissent avec un système nerveux très immature, présentent un taux élevé de SP au cours des premières semaines de leur vie postnatale (Jouvet et coll. 1961; Valatx 1963; Valatx et coll. 1964; Jouvet-Mounier 1968). Au fur et à mesure de la maturation du cerveau et de l'achèvement du processus de myélinisation, le taux de SP diminue et rejoint celui de l'adulte. En revanche, le cobaye qui présente un cerveau dont la maturation est achevée à sa naissance, réalise dès les premières heures de sa vie des quantités de SP comparables à celles de l'adulte. Cependant, si l'on enregistre son sommeil *in utero*, à un stade où son

développement cérébral est analogue à celui d'un raton nouveau-né, on observe des quantités de SP très importantes, équivalentes à celles relevées chez le raton à sa naissance (Jouvet-Mounier et coll. 1970). Les quantités de SP apparaissent donc comme un indice du niveau de maturation cérébrale, cet état prédominant lors de la mise en place des processus les plus complexes du développement du système nerveux.

IV. Rôle du SP dans l'apprentissage

De nombreux résultats suggèrent une action du SP dans les processus cognitifs en renforçant l'apprentissage, la mémoire et les facultés d'adaptation (Smith 1985; Hennevin et coll. 1995). Ainsi, on observe chez le rat une augmentation des quantités de SP après un apprentissage spatial (Smith et Lapp 1991). A l'inverse, une privation spécifique de SP altère les performances des rats à des tâches de référence spatiale (Smith et coll. 1998). De plus, de récents travaux montrent chez le rat que les motifs spatio-temporels d'activation des cellules de lieu de l'hippocampe observés au cours d'un apprentissage spatial durant l'éveil sont rejoués durant le SP qui suit l'apprentissage (Louie et Wilson 2001). De même chez l'homme, les techniques d'imagerie fonctionnelle montrent qu'un apprentissage procédural provoque une augmentation de l'activité cérébrale dans les mêmes aires que celles impliquées lors de l'exécution de la tâche chez le sujet éveillé (Maquet et coll., 2000).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle clé du SP dans les phénomènes de mémorisation. Cependant, il est important de noter que le SP intervient surtout lors des processus de consolidation de tâches dépendantes de l'hippocampe (Stickgold et coll. 2001; Stickgold et Walker 2005). De plus, il apparait que le rôle du SP sur les phénomènes de consolidation ne peut être dissocié du SL. Ainsi, les phénomènes de "réverbération neuronale" intervenant suite à l'apprentissage seraient fortement dépendants du SL alors que les modifications transcriptionnelles, nécessaires à la mise en place d'un stockage à long terme de l'information, seraient elles dépendantes des épisodes de SP (Ribeiro et Nicolelis 2004).

Cependant, le rôle du SP dans les phénomènes de mémorisation fait encore l'objet d'un débat acharné au sein de la communauté neuroscientifique. (Vertes et Siegel 2005). En effet, comment expliquer les performances « normales » de personnes n'effectuant plus de SP suite à l'utilisation d'IMAO (inhibiteurs des monoamines oxydases, qui provoque, sinon une

suppression, du moins une forte diminution des quantités de SP) ou suite à des lésions cérébrales ? (Siegel 2001).

III. Rôle du SP dans la neurogenèse

L'apparition de l'homéothermie, en permettant une liberté plus grande par rapport aux conditions thermiques de l'environnement, s'est accompagnée d'une diminution considérable de la neurogenèse postnatale. En effet, chez les poissons, amphibiens et reptiles, il existe une croissance continue du cerveau pendant toute la vie des individus, assurée par une neurogenèse constante. Les mammifères ne conservent qu'en partie cette faculté après le premier mois qui suit la naissance, notamment dans le gyrus denté de l'hippocampe et le bulbe olfactif (Gross 2000), mais ces neurones néo-formés ne représentent qu'une infime proportion de l'ensemble des cellules du système nerveux central. Cependant, compte tenu de la coïncidence de la diminution de la neurogenèse chez l'adulte et de l'apparition du SP, une hypothèse séduisante voudrait que le SP permette d'optimiser la présence du peu de neurones néo-formés qui se constituent en régulant leur prolifération, leur migration et leur différenciation. En accord avec cette idée, il a récemment été montré que la privation de SP altérait la neurogenèse dans l'hippocampe de rat adulte (Hairston et coll. 2005) et que la privation totale de sommeil (SL et SP) altère l'apprentissage de tâches dépendantes de l'hippocampe, connue pour stimuler la survie des neurones nouvellement formés de l'hippocampe (Guzman-Marin et coll. 2005).

V. Rôle du SP dans la conservation des comportements innés

La théorie itérative, chère à Michel Jouvet, attribue au SP une fonction de gardien de l'individuation psychologique (Jouvet 1991). Cette hypothèse repose sur différentes observations :

- Il existe des bases génétiques conditionnant certains comportements. Cela est évident chez les animaux, où il a été mis en évidence de nombreux comportements innés. Cela expliquerait également « l'hérédité psychologique de jumeaux monozygotes élevés dans des milieux sociaux différents (Bouchard 1984; Bouchard et coll. 1990).

- Il existe des comportements stéréotypés caractéristiques de l'espèce chez le chat au cours du SP. Ces comportements sont révélés après lésions des noyaux peri-LCα qui contrôlent les neurones glycinergiques bulbaires à l'origine de l'inhibition des motoneurones spinaux durant le SP (Sastre et Jouvet 1979) (figure 2).
- Il existe une composante génétique des événements phasiques associés au SP (mouvements oculaires, ondes PGO…) chez la souris (Valatx et coll. 1972; Valatx et Bugat 1974; Valatx et coll. 1980).

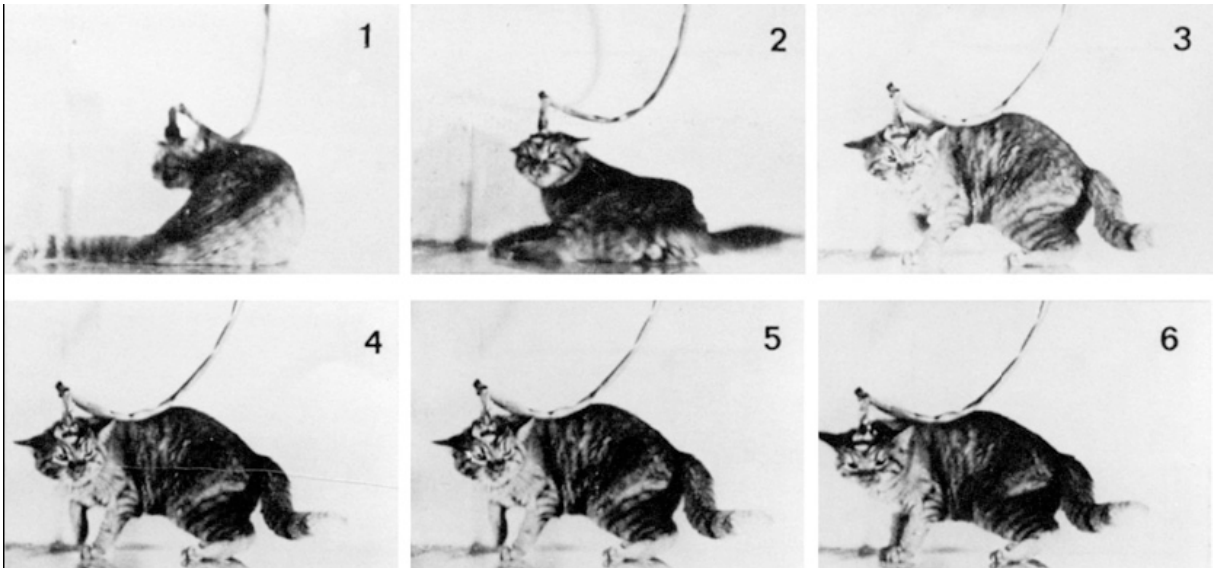


Figure 2 : Photographies d'un chat sans atonie musculaire au cours du sommeil paradoxal. Cet animal présente des comportements oniriques suite à une lésion bilatérale du centre de contrôle de l'atonie (péri-LC-alpha). Il exprime une posture caractéristique d'une réaction de défense en réponse à une attaque. (D'après (Sastre et Jouvet 1979).

Etant donné les modifications dues à l'environnement, il apparait improbable que les différences héréditaires de comportement entre individus puissent être entièrement et définitivement codées par le génome lors de la maturation du système nerveux.

Une fonction du SP pourrait donc être d'assurer la pérennité des mécanismes intégratifs et moteurs qui sous-tendent les comportements innés. L'expression des comportements stéréotypés de l'espèce serait périodiquement réactivée pendant le SP dans le but de les conserver durant toute la vie de l'individu.

VI. Conclusion

Malgré plus de 50 années de recherche et de nombreuses études sur les rôles possible du SP, beaucoup de questions restent en suspens. C'est pourquoi l'étude des réseaux neuronaux à l'origine de la régulation des différents états de vigilance nous semble être une approche de choix afin de mieux comprendre le (ou les) rôle(s) du sommeil.

De nombreuses études ont conduit à l'individualisation de structures cérébrales spécifiquement impliquées dans les mécanismes de genèse de l'éveil, du SL et du SP.

Au cours de cette thèse nous nous sommes concentrés sur l'étude des mécanismes impliqués dans le déclenchement et le maintien du SP. Toutefois, seule une constante interaction réciproque entre les systèmes d'éveil, de SL et de SP permet d'expliquer l'alternance et la régulation des états de vigilance.

Par conséquent, dans les parties introductives qui vont suivre, nous résumerons les principales avancées qui ont permis de définir les différentes structures nerveuses impliquées dans la genèse et le maintien de l'éveil, du SL et du SP.

Structures et mécanismes de régulation de l’éveil.

Au cours de l'épidémie d'encéphalite qui toucha l’europe en 1916 (la grippe espagnole), certains malades présentaient une forte somnolence.

L'examen de leur cerveau permit à Constantin von Economo (1931), de décrire des lésions à des endroits différents selon l'allure clinique de la maladie. Les malades somnolents présentant une lésion de l'hypothalamus postérieur ou de la partie haute du mésencéphale, Von Economo donna le nom de *Wachzentrum* (centre de l'éveil en allemend) à cette région. Le rôle de l’hypothalamus postérieur dans la genèse de l’EV fut ensuite confirmé par l’hypersomnie consécutive à sa lésion électrolytique, chez le singe (Ranson 1939), le rat (Nauta 1946) et le chat (Swett et Hobson 1968).

A l’aide d’experiences montrant que la stimulation électrique de la formation réticulée ponto-mésencéphalique d’un chat endormi provoque son réveil, Moruzzi et Magoun (1949) ont mis en évidence l’existence du système réticulé activateur ascendant. Afin de préciser la zone effectrice, Lindsley et coll., (1949; 1950) effectuèrent des lésions par coagulation au sein de cette formation réticulée ponto-mésencéphalique. Ils démontrèrent ainsi que l'on pouvait supprimer l'activité rapide corticale d'éveil et entraîner une somnolence de longue durée chez le chat ou le singe. La formation réticulée mésencéphalique devenait ainsi le centre de l’éveil. Cependant, la mise au point au début des années 1980 de nouvelles techniques de lésions ne détruisant que les corps cellulaires sans altérere les fibres de passages remit en cause cette démonstration. Il fut en effet démontré que la destruction totale des corps cellulaires de la formation réticulée mésencéphalique par micro-injection d'acide kaïnique ou iboténique n'entraîne aucun trouble de l'éveil comportemental, ni altération de l'activation corticale (Denoyer et coll. 1989). Il fallut donc bien convenir que l’hypersomnie qui faisait suite à la destruction par coagulation de la formation réticulée mésencéphalique était due à l'interruption de voies ascendantes ou descendantes d'autres systèmes ou réseaux responsables de l'éveil.

Le développement de nouvelles techniques neuro-anatomiques a permis de délimiter de nouveaux systèmes utilisant différents neurotransmetteurs. Au début de la théorie réticulaire, seule l'acétylcholine était connue comme neurotransmetteur cérébral. En 1964, furent découverts les systèmes aminergiques: noradrénaline, adrénaline, dopamine, sérotonine (Dahlstrom et Fuxe 1964). Le système à histamine fut ensuite décrit (Kuhar et coll. 1971),

ainsi que de nouveaux systèmes cholinergiques. Enfin, des systèmes fonctionnant avec des acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate ; (Fonnum et coll. 1979) ou inhibiteurs (glycine, GABA ; (Okada 1977) furent décrits.
L'on passa ainsi d'une structure unique de régulation de l'EV à un réseau distribué dont nous décrirons les acteurs principaux dans ce chapitre.

I. Le système noradrénergique du Locus cœruleus

A – Anatomie

Les neurones synthétisant la Noradrénaline (NA) sont largement distribués au sein du système nerveux central, laissant supposer un rôle clé de ce neurotransmetteur dans diverses fonctions.
La majorité des neurones NA du SNC (environ 60%) sont localisés dans le noyau du Locus cœruleus (LC), décrit comme le groupe adrénergique A6 par Dahlstrom (1964).
Le LC est une structure pontique bilatérale clairement délimitée située ventralement au plancher du 4ème ventricule et n'étant composée que d'un nombre limité de neurones : environ 1500 par noyau chez le rat et 10000 à 15000 chez l'homme.
Le LC projette à l'ensemble du névraxe, de la moelle épinière au néocortex (figure 3 ;(Swanson et Hartman 1975; Foote et coll. 1983).

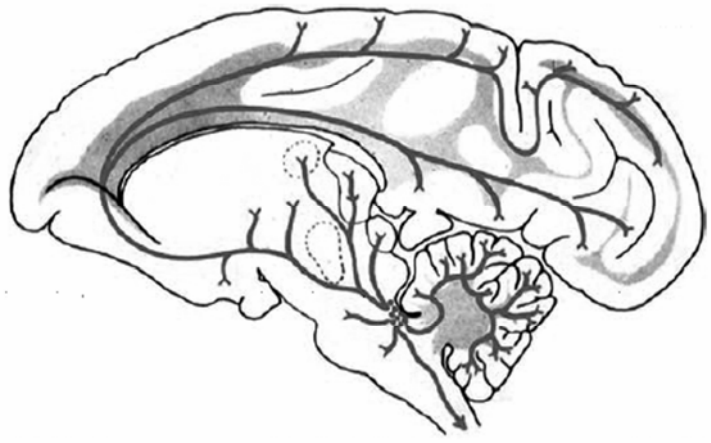


Figure 3 : Illustrations des projections du LC. Coupe sagittale chez le singe. Notez les projections diffuses à l'ensemble du névraxe. (D'après (Aston-Jones et Cohen 2005).
Ainsi, le LC apparait comme la principale source de NA au sein du SNC. Il est important de noter qu'il représente l'unique source de NA au niveau de l'hippocampe et du cortex (Swanson et Hartman 1975; Foote et coll., 1983).

Les premières études des projections efférentes du LC ont mis en évidence une topographie au sein de ce noyau. Les neurones projetant au septum et à l'hippocampe seraient localisés dans le LC dorsal alors que les neurones projetant au cervelet seraient préférentiellement localisés dans les parties ventrales du noyau. (Mason et Fibiger 1979). D'autres études plus récentes montrent également que les neurones projetant au cortex sont préférentiellement localisés dans la partie caudale du LC et que ces projections sont très massivement ipsilatérales (Waterhouse et coll. 1983). En plus d'une organisation antéro-postérieure, il existerait une organisation dorso-ventale des projections corticales au sein du LC. Ainsi, les neurones projetant au cortex occipital seraient localisés dans la partie dorsale du LC alors que les neurones projetant au cortex préfrontal seraient localisés dans la partie ventrale de ce noyau (Waterhouse et coll., 1983).
Enfin, il semblerait que chaque neurone NA du LC innerve de multiples régions cibles impliquées dans une même fonction : les neurones du LC innervant le cortex somatosensoriel projettent également préférentiellement au noyau thalamique somatosensoriel plutôt qu'aux noyaux thalamiques non somatosensoriels (comme le noyau thalamique géniculé latéro-dorsal) (Simpson et coll. 1997). Ces neurones pourraient ainsi être à l'origine d'une réponse coordonnée de plusieurs structures cibles.

Les premières études des afférences au LC ont mis en évidence des projections venant de l'ensemble du SNC (Cedarbaum et Aghajanian 1978; Clavier 1979).
Des travaux utilisant des éjections plus restreintes de traceurs rétrogrades ont cependant décrit deux afférences principales au LC: Le noyau réticulé paragigantocellulaire et le prepositus hypoglossi (Aston-Jones et coll. 1986).
Plus récemment, des éjections iontophorétiques de la sous-unité b de la toxine cholérique (CTb), restreintes au LC, ont permis de mettre en évidence des projections denses venant de la région préoptique, des aires hypothalamiques postérieures, de la substance grise périaqueducale et du noyau Kölliker-Fuse (Luppi et coll. 1995).
Bien que le LC soit une structure bien délimitée, des études en microscopie électronique ont montré la présence de dendrites NA qui s'étendent au-delà du noyau proprement dit (Shipley et coll. 1996). Cette région, appelée peri-LC reçoit de denses projections venant en particulier du cortex préfrontal, du noyau central de l'amygdale, de l'hypothalamus latéral, du noyau du raphé dorsal… (Pickel et coll. 1977; Arnsten et Goldman-Rakic 1984; Peyron et coll. 1998; Van Bockstaele et coll. 1998; Van Bockstaele et coll. 1999).

B –Physiologie

-Electrophysiologie

Que ce soit chez l'animal vigile ou anesthésié, les neurones NA du LC sont caractérisés par une fréquence de décharge faible (de 0 à 5 Hz), des potentiels d'actions (PA) larges (de 1 à 2 ms) et par des bouffées de PA suivies par une période d'inactivité.

Des enregistrements multi-unitaires au niveau du LC ont également pu mettre en évidence une synchronisation des neurones du LC, permettant une libération massive de NA dans l'ensemble du névraxe (Aston-Jones et Bloom 1981; Aston-Jones et Bloom 1981). Cette synchronisation de décharge des neurones du LC n'est pas médiée par une libération de neurotransmetteurs. En effet, il a été montré une suppression de cette synchronisation suite au blocage des jonctions gap ou par isolation des corps cellulaire de la zone dendritique du peri-LC (Ishimatsu et Williams 1996). Ainsi, les neurones du LC seraient électriquement couplés via des interactions au niveau du peri-LC.

Il est important de noter que les neurones du LC déchargent selon 2 modalités différentes : une décharge tonique et une décharge phasique.

L'activité tonique du LC est caractérisée par une décharge relativement lente, et très régulière. Il a été montré, dès 1975 que la fréquence de décharge des neurones NA du LC était modulée par les états de vigilance. Ainsi, ces neurones déchargent le plus fortement durant l'EV (entre 2 et 4 Hz), diminuent leurs fréquences de décharge durant le SL (Entre 0,5 et 1 Hz) pour devenir inactifs en SP (figure 4). De plus, les variations de fréquence de décharge des neurones du LC anticipent le changement d'état de vigilance :

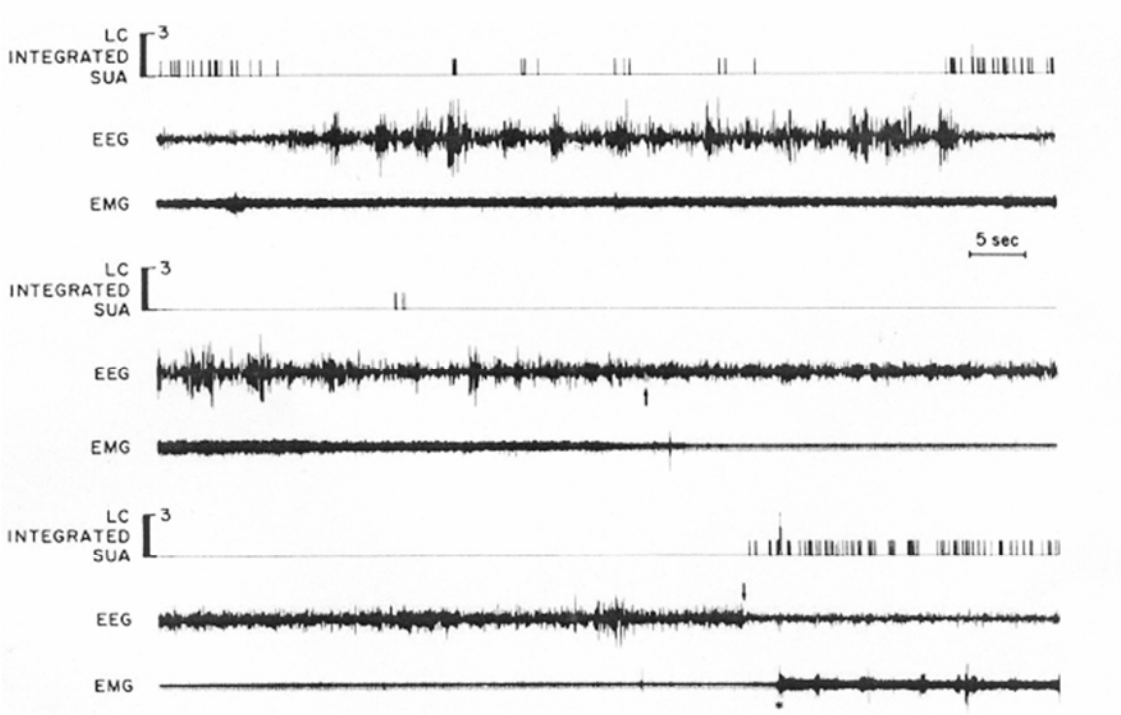


Figure 4 : Activité spontanée d'un neurone du LC au cours des différents états de vigilance.. Ce neurone est totalement inactif durant le SP (en bas) et s'active des le retour des critères EEG de l'EV (flèche) en anticipant le retour du tonus musculaire (étoile). (D'après (Aston-Jones et Bloom 1981)

Durant les épisodes d'EV, la décharge des neurones du LC peut présenter une fréquence élevée (pouvant atteindre 15 Hz durant de courtes périodes) lors d'un éveil attentif ou quand le rat est placé face à un défi comportemental (Foote et coll. 1980).

Le taux extracellulaire de NA étant lié de manière linéaire à la fréquence de décharge des neurones du LC, les faibles variations de fréquence de décharge des neurones du LC au cours du cycle veille-sommeil s'accompagnent de fortes variations de la libération de NA au niveau des structures cibles (Berridge et Abercrombie 1999).

L'activation phasique des neurones du LC est liée à la présentation de stimuli marquants (Aston-Jones et Bloom 1981). De plus, cette activation phasique est sujette à un processus d'habituation : plus le stimulus est présenté, moins la réponse phasique est importante.

L'activation phasique des neurones du LC conduit-elle à une plus forte libération de NA au niveau des structures cibles, a l'image de la libération de dopamine, clairement augmentée lorsque les neurones dopaminergiques déchargent en bouffées de PA ((Bean et Roth 1991) ? Il a en effet été montré une augmentation de la libération de NA lors d'une longue stimulation des neurones NA du LC suivant un motif en bouffées de PA comparativement à la libération de NA lorsque les neurones du LC déchargent de manière tonique à la même fréquence

(Florin-Lechner et coll. 1996). Cependant, la non considération par ces auteurs de la décharge tonique intervenant entre les bouffées de PA ne permet pas de tirer de conclusion claire.

-Les neurones NA du LC et la régulation de la vigilance

Historiquement, le LC fut tout d'abord considéré comme une structure impliquée dans la genèse du SP. En effet, la lésion électrolytique du tegmentum pontique chez le chat (incluant les neurones NA du LC) provoque une suppression du SP et/ou de l'atonie musculaire caractéristique de cet état (Jouvet et Delorme 1965). Cependant, des études basées sur des lésions plus restreintes au LC ont mis en évidence que l'effet observé sur le SP était en fait dû à la lésion de la région ventrale au LC plutôt qu'au LC lui-même (Jones et coll. 1977).

Actuellement, de nombreuses données expérimentales indiquent que le LC serait une structure impliquée dans la régulation de l'EV et de la désynchronisation corticale accompagnant cet état. En effet, l'administration d'α-methyl-para-tyrosine (AMPT, inhibiteur de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme de synthèse des catécholamines), induit une augmentation des quantités de SP et une diminution des quantités d'EV (Leppavuori 1980). De plus, l'inactivation bilatérale des neurones NA du LC par l'injection d'un agoniste des récepteurs α2 adrénergiques (autorécepteurs) induit une forte augmentation de la puissance des ondes lentes de l'EEG (Berridge et coll. 1993).

Au voisinage du LC, il a été de plus enregistré des neurones dont l'activité est strictement inverse de celle des neurones SP-off du LC (Sakai 1985). Ces neurones, déchargeant uniquement durant les épisodes de SP (neurones dit SP-on), sont composés de neurones cholinergiques des tegmentum ponto-mésencéphalique (LDT/PPT) et de neurones non cholinergiques du noyau du péri-LC α chez le chat (cholinoceptifs) ou sub-cœruleus chez le rat (non cholinoceptifs).

La proximité de ces deux types de neurones a conduit à l'élaboration de divers modèles d'interactions inhibitrices réciproques (McCarley et Hobson 1975 ; Sakai 1988; McCarley et Massaquoi 1992). Selon cette hypothèse, l'inhibition des neurones NA du LC serait une condition nécessaire à la survenue du SP. Comme l'acétylcholine a un effet excitateur sur les neurones du LC (Guyenet et Aghajanian 1979; Egan et North 1986), il existerait des interneurones inhibiteurs glycinergiques et/ou GABAergiques (Jones 1991).

En accord avec cette hypothèse, il a été montré sur le rat vigile en contention, que les neurones NA du LC sont en permanence sous un tonus inhibiteur glycinergique (Darracq et coll. 1996) et GABAergique (Nitz et Siegel 1997; Gervasoni et coll. 1998). Cependant, seul le tonus inhibiteur GABAergique présente une modulation en fonction des états de vigilance :

il est minimum durant l'EV, augmente durant le SL pour devenir maximal pendant le SP (Gervasoni et coll., 1998).

Une des étapes clé pour une meilleure compréhension de la régulation du SP, est la localisation des neurones GABAergiques spécifiquement activés durant le SP et projetant au LC. Ainsi Verret et coll., (2006) ont démontré qu'une forte proportion des neurones du noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal (DPGi), du noyau réticulé paragigantocellulaire latéral (LPGi) et de la partie rostrale de la substance grise périaqueducale (PAG) expriment le C-Fos (utilisé comme marqueur d'activité cellulaire) suite à un rebond de SP et projettent au LC. De plus, la majorité de ces neurones exprimant le C-Fos après rebond de SP sont également GABAergique (Emilie Sapin, communication personnelle).

Ainsi, l'une de ces trois structures pourrait être à l'origine de l'inhibition des neurones du LC au cours du SP.

L'ensemble de ces données indique que le LC joue un rôle prépondérant dans la genèse et le maintien de l'EV et de l'activation corticale caractéristique de cet état. De plus, selon le modèle d'interaction inhibitrice réciproque, il aurait un rôle permissif vis-à-vis du SP. Ainsi, l'inhibition du LC semble être une étape indispensable à la survenue d'un épisode de SP.

II. Le système sérotoninergique du noyau du Raphé dorsal

A – Anatomie

Le noyau du raphé dorsal (NRD) est situé dans la partie rostrale du pont et fait partie des noyaux du raphé situés sur la ligne médiane dans le tronc cérébral. Il contient environ 48% des neurones sérotoninergiques (5-HT) du SNC (Wiklund et coll. 1981).

La sérotonine est le neuromédiateur majoritaire du NRD. En effet, il a été montré, chez le rat, que la majorité des neurones du NRD étaient de types 5-HT (Descarries et coll. 1982). Ces neurones constituent ainsi les groupes 5-HT B6 et B7 décrits par Dahlström et Fuxe (1964).

Les neurones 5-HT du NRD présentent une organisation topographique en fonction de la forme de leur corps cellulaire. Ainsi 4 groupes peuvent être mis en évidence : un groupe de cellules rondes de faible diamètre, un groupe de cellules de taille moyenne, fusiforme ou

bipolaire, un groupe de cellules de grand diamètre fusiforme et enfin un groupe de grandes cellules multipolaires (Steinbusch 1984).

A l'image du LC, le NRD projette à l'ensemble du névraxe. Les voies ascendantes innervent le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le télencéphale basal, le noyau préoptique, le striatum, le thalamus, la substance grise périaqueducale et la formation réticulée mésencéphalique. Les projections descendantes des neurones du NRD se terminent dans le noyau parabrachial ainsi que dans la formation réticulée pontique et bulbaire (Vertes 1991; Vertes et Kocsis 1994).

Il existerait également, au sein du NRD, une organisation rostro-caudale des projections ascendantes. Ainsi, les neurones 5-HT localisés dans la partie rostrale du NRD projetteraient particulièrement au niveau du noyau caudé putamen, de la substance noire et des aires corticales alors que les neurones localisés dans la partie caudale du NRD projetteraient eux spécifiquement au septum et à l'hippocampe (Steinbusch et coll. 1981; Steinbusch 1984; Vertes 1991).

A l'image des neurones NA du LC, chaque neurone 5-HT du NRD projetterait à plusieurs structures cibles fonctionnellement liées, comme les structures impliquées dans la réponse au stress (Lowry 2002), permettant ainsi une réponse coordonnée des différentes structures.

Les voies nerveuses afférentes au NRD proviennent rostralement de l'habenula latérale, des cortex cingulaire, orbital, infralimbique et insulaire, des aires préoptiques médiale et latérale, ainsi que des aires hypothalamiques dorsale, postérieure et périfornicale (Peyron 1996). Il a été observé que le NRD recevait des projections caudales en provenance de la formation réticulée mésencéphalique, de la substance grise périaqueducale, du noyau parabrachial latéral, des noyaux paragigantocellulaires dorsal et latéral et du noyau du faisceau solitaire (Peyron 1996). Le NRD est ainsi soumis à une multitude d'influences en provenance de l'ensemble du névraxe.

B – Physiologie

-Electrophysiologie

Les neurones 5-HT du LC sont caractérisés par une fréquence de décharge faible (de 0 à 5 Hz) et des potentiels d'actions (PA) larges (environ 2 ms)

Chez le chat (Lydic et coll. 1987; Lydic et coll. 1987) et le rat (Gervasoni et coll. 2000), les neurones 5-HT du NRD sont de type SP-off (figure 5): ils présentent une fréquence de

décharge maximale durant l'EV (de 1 à 3 Hz), qui diminue durant le SL (environ 0,5 Hz) pour devenir quasiment nulle durant le SP :

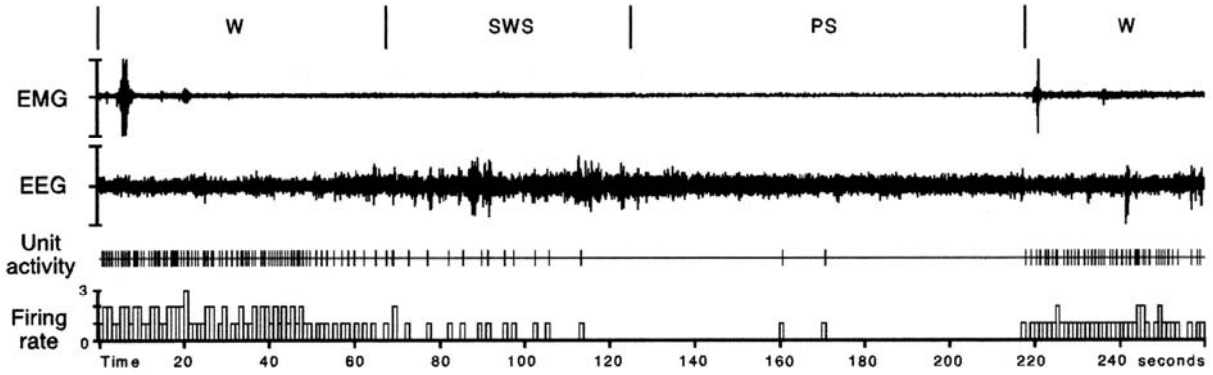


Figure 5 : Activité spontanée d'un neurone du 5-HT du NRD au cours des différents états de vigilance chez le rat. Ce neurone diminue fortement sa fréquence de décharge durant le SP. (D'après (Gervasoni et coll., 2000)

Chez l'animal vigile, les neurones 5-HT du NRD peuvent présenter une activation suite à la présentation d'un stimulus sensoriel, sonore ou visuel (Koyama et coll. 1994).

Il est important de noter que les neurones 5-HT du NRD présentent une certaine hétérogénéité au niveau de leur fréquence de décharge relative aux états de vigilance. Ainsi, Rasmussen et coll., Sakai et coll., et Urbain et coll., ont déterminé jusqu'à 6 classes de neurones présumés 5-HT au sein du NRD (Rasmussen et coll. 1984; Sakai et Crochet 2001 ; Urbain et coll. 2006).

- Les neurones 5-HT du NRD et la régulation de la vigilance

La 5-HT fut tout d'abord considérée comme « le » neurotransmetteur du sommeil. En effet, la destruction par coagulation des neurones 5-HT induisait une insomnie qui pouvait durer plusieurs semaines (Jouvet 1969). De plus, l'injection intrapéritonéale de p-chlorophénylalanine (PCPA), un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase, provoquait une suppression totale du SL profond et du SP durant une période de 2 à 3 jours (Koella et coll. 1968). Chez des chats rendus insomniaques par la PCPA, l'injection de 5-HTP (5-hydroxytryptophane, le précurseur de la 5-HT) restaurait à la fois le SL et le SP. Ainsi, la 5-HT, ou « somnotonine », comme l'appelait Koella (1969) apparaissait comme un maillon décisif de l'endormissement.

Selon la théorie sérotoninergique du sommeil, la 5-HT devrait être le neurotransmetteur du sommeil. L'activité électrique des neurones 5-HT devrait donc être minimale en EV, augmenté en SL pour devenir maximale en SP. Or, comme décrits précédemment, les neurones 5-HT du NRD sont, chez le chat et le rat, de type SP-off. De plus, les expériences de

voltamétrie révélèrent que la libération de 5-HT au niveau du cortex augmentait durant l'EV pour diminuer durant le sommeil (Cespuglio et coll. 1984). Toute relation synchronique entre libération de 5-HT et sommeil s'avérait donc impossible. C'est ainsi qu'apparut la théorie diachronique du rôle de la 5-HT dans la régulation du sommeil. Il a été proposé que la 5-HT serait libérée suivant deux modalités au cours du cycle veille-sommeil: par les terminaisons axonales au cours de l'éveil et par les dendrites et/ou les corps cellulaires au cours du sommeil. Selon Cespuglio et coll. (1992), la 5-HT libérée par les terminaisons axonales pendant l'éveil induirait la synthèse et la libération de peptides hypnogènes (El Kafi et coll. 1994). L'accumulation de ces substances induirait alors le SL au cours duquel la libération somato-dendritique induirait une inhibition des neurones du NRD (El Kafi et coll. 1995), condition nécessaire à l'apparition du SP.

L'ensemble de ces données indique donc que la diminution puis l'arrêt de décharge des neurones 5-HT du NRD serait indispensable à l'apparition du sommeil lent puis du SP.

III. Le système cholinergique du tegmentum ponto-mésencéphalique

A – Anatomie

Ce système est constitué de neurones cholinergiques distribués dans les noyaux tegmentaux latérodorsal (LDT) et pédonculopontin (PPT). Chez le rat, il y aurait environ 2000 neurones cholinergiques par hémisphère au sein de ces noyaux (Rye et coll. 1987).
Cependant, il est à noter que le PPT et le LDT ne sont pas composés uniquement de neurones cholinergiques. Il a ainsi été montré la présence de neurones immunoréactifs à la NADPH-diaphorase (neurones exprimant la NOS, Nitic oxyde synthase, enzyme de synthese du NO (Vincent et coll. 1986)), le CRF (Vincent et coll., 1986), la substance P (Vincent et coll., 1986) et le glutamate (Lavoie et Parent 1994).

Les neurones cholinergiques du complexe LDT-PPT sont à l'origine de projections ascendantes, principalement au niveau thalamique (Rye et coll., 1987).
Ces noyaux mésopontiques sont également à l'origine des projections cholinergiques ascendantes sur l'hypothalamus postérieur, le télencéphale basal, et dans une moindre mesure

l'aire préoptique latérale (Woolf et Butcher 1986; Hallanger et coll. 1987; Pare et coll. 1988; Smith et coll. 1988; Steriade et Biesold 1990; Semba et Fibiger 1992).

Le LDT et le PPT reçoivent des projections en provenance du télencéphale basal, de la région préoptique, de la zona incerta et de l'aire latérale de l'hypothalamus postérieur, de l'habénula latérale, de la substance grise périaqueducale et de la formation réticulée mésencéphalique (Satoh et Fibiger 1986; Cornwall et coll. 1990; Semba et Fibiger 1992; Reese et coll. 1995).
De plus, il a été mis en évidence, au sein du complexe LDT-PPT, des fibres immunoréactives à la 5-HT (Steininger et coll. 1997), à la TH (tyrosin hydroxylase, enzyme de synthèse des catécholamines; (Vincent et coll., 1986)) ou à l'histamine (Lin et coll. 1996).

B – Physiologie

Les enregistrements électrophysiologiques au cours du cycle veille-sommeil des neurones du LDT et du PPT chez le chat et le rat révèlent qu'une majorité de ces cellules a un taux de décharge plus important durant l'éveil et le SP que durant le sommeil lent (El Mansari et coll. 1989; Kayama et coll. 1992 ; Datta et Siwek 2002).

De par l'absence de projections sur l'ensemble du cortex, les noyaux tegmentaux pontomésencéphaliques ne peuvent avoir une influence directe sur l'activité corticale. L'acétylcholine libérée par ces neurones parvient cependant à la moduler de façon indirecte via les neurones du noyau réticulé thalamique (McCormick et Prince 1986) et les neurones thalamo-corticaux des noyaux intra-laminaires (McCormick et Prince 1987). Cependant la lésion neurotoxique d'une majorité de ces neurones cholinergiques ponto-mésencéphaliques n'engendre aucun déficit notable de l'activation corticale et ne diminue pas les quantités d'éveil (Webster et Jones 1988).

IV. Le Télencéphale basal

A – Anatomie

Ce complexe est constitué d'un ensemble de structures incluant le septum médian, le noyau basal de Meynert, la substance innominée et les bandes diagonale, verticale et horizontale de Broca (Heimer et Alheid 1991). Ce complexe hétérogène contient des neurones synthétisant de l'acétylcholine (Mesulam et coll. 1984), de l'aspartate (Lin et coll. 1994), du GABA (Brashear et coll. 1986) ou du glutamate (Gritti et coll. 1993).

Les neurones cholinergiques du télencéphale basal (TB) innervent d'une manière diffuse le cortex, le thalamus et l'hippocampe (Mesulam et coll. 1983; Levey et coll. 1987). Ils seraient ainsi un relais extra-thalamique du système réticulé ponto-mésencéphalique vers le cortex cérébral pour contrôler l'activité corticale à travers le cycle veille-sommeil. Le TB reçoit des projections histaminergiques de l'hypothalamus postérieur, sérotoninergiques du NRD et noradrénergiques du LC (Jones et Cuello 1989; Lin et coll., 1994).

B – Physiologie

La stimulation du TB induit l'éveil, tandis qu'une lésion de cette région à l'acide iboténique (lésion des corps cellulaires tout en épargnant les fibres de passage) entraîne l'apparition d'ondes lentes transitoires chez le chat et le rat (Buzsaki et coll. 1988).
De plus, la stimulation électrique ou chimique du TB induit une activation corticale avec une prédominance d'ondes gamma et thêta (Metherate et coll. 1992; Maloney et coll. 1997; Cape et Jones 2000; Cape et coll. 2000). La contribution du TB à l'activation corticale est à la fois directe et indirecte, via l'inhibition du noyau réticulé thalamique (impliqué dans la genèse des oscillations lentes corticales) et la désinhibition des neurones intralaminaires du thalamus (McCormick 1989).
Récemment, il a pu être déterminé l'activité électrophysiologique au cours du cycle veille-sommeil de neurones identifiés comme cholinergiques au sein du TB (figure 6).

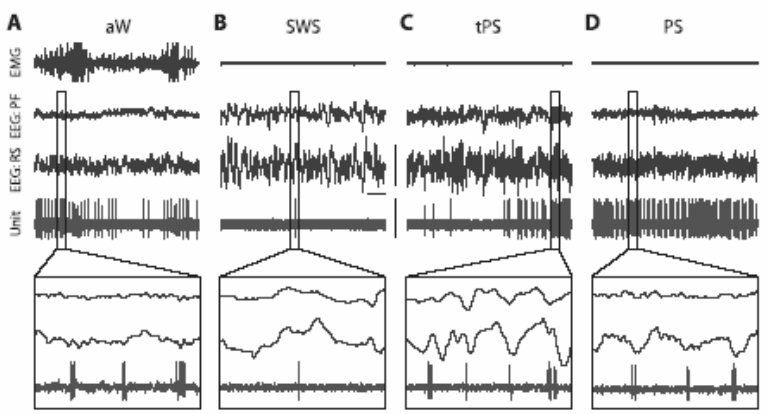


Figure 6 : Activité spontanée d'un neurone cholinergique du TB au cours des différents états de vigilance chez le rat. Ce neurone présente une activation en bouffée de PA durant l'EV (aW) et le SP (PS). (D'après (Lee et coll. 2005)

La fréquence de décharge de ces neurones est maximale Durant le SP (environ 16 Hz), intermédiaire durant l'EV actif (environ 7 Hz) et faible durant le SL (environ 1 Hz). De plus, les neurones ACh du TB déchargent en bouffées de PA durant l'éveil actif et le SP, les deux états de vigilance où les activités gamma et thêta sont prépondérantes (Lee et coll., 2005).

L'ensemble de ces données indique donc que le système cholinergique du TB participerait activement à l'activation corticale observée durant l'EV mais également durant le SP.

V. Le système histaminergique du noyau tubéromammillaire

A – Anatomie

Les neurones synthétisant l'histamine sont exclusivement localisés dans une petite région de l'hypothalamus postérieur : le noyau tubéromammillaire ou TMN (Panula et coll. 1984; Watanabe et coll. 1984; Lin et coll. 1986).

Les neurones histaminergiques, à l'instar des autres neurones monoaminergiques projettent à l'ensemble du système nerveux central, et spécialement aux structures cérébrales impliquées dans la régulation des états de vigilance. Les neurones histaminergiques projettent ainsi sur le cortex, le thalamus, la région préoptique, la substance grise périaqueducale, l'amygdale, le striatum, l'hippocampe, la substance noire et l'aire tégmentale ventrale (Panula et coll. 1989).

De plus, les neurones histaminergiques du TMN projettent sur les neurones cholinergiques et monoaminergiques du tronc cérébral (Panula et coll., 1989).

Les neurones du TMN reçoivent des projections afférentes du cortex préfrontal, du septum, de la région préoptique et des neurones à hypocrétines de l'hypothalamus postérieur (Wouterlood et coll. 1987; Ericson et coll. 1991; Peyron et coll., 1998). L'innervation monoaminergique de ce noyau provient du tronc cérébral, en particulier des groupes adrénergiques C1-C3, noradrénergiques A1-A2 et sérotoninergiques B5-B9 (Ericson et coll., 1991).

B – Physiologie

-Electrophysiologie

Les études électrophysiologiques *in-vitro* ont montré que les neurones histaminergiques présentaient des caractéristiques similaires aux autres neurones aminergiques impliqués dans la régulation de l'éveil comme les neurones NA du LC et 5-HT du NRD. Ces neurones ont ainsi une fréquence de décharge spontanée faible mais régulière et des PA de large amplitude (Haas et Reiner 1988).

Chez l'animal libre de ses mouvements, les neurones du TMN présentent une décharge tonique seulement durant l'EV (Sakai et coll. 1990; Steininger et coll. 1999). Ainsi, de par leur localisation et leur mode de décharge, ces neurones pourraient correspondre aux neurones histaminergiques. En accord avec cette hypothèse, une étude récente apporte des arguments supplémentaires quant à la nature EV-on des neurones histaminergiques (figure 7). En effet, il a été montré que la fréquence de décharge des neurones EV-on du TMN était diminuée par l'injection d'un agoniste des récepteurs H3 (autorécepteur à l'histamine) alors que cette fréquence de décharge était augmentée par l'injection d'un antagoniste H3 (Vanni-Mercier et coll. 2003).

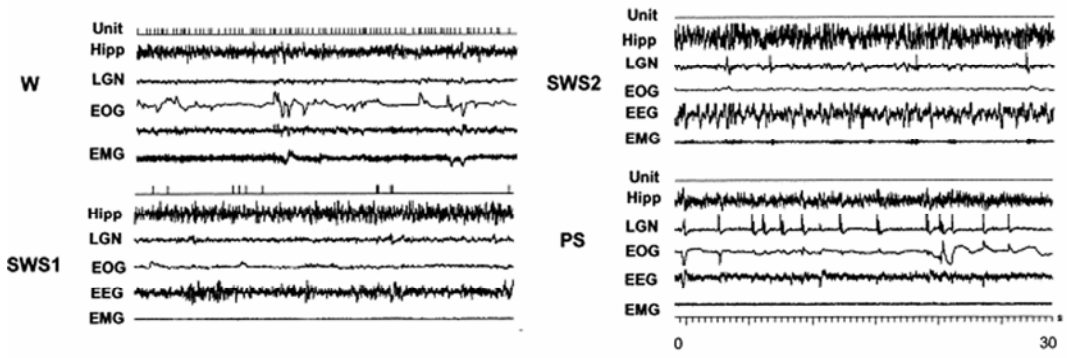


Figure 7 : Activité spontanée d'un neurone supposé histaminergique du TMN au cours des différents états de vigilance chez le chat. Ce neurone diminue fortement sa fréquence de décharge durant le SL pour devenir inactif durant le SP. (D'après (Vanni-Mercier et coll., 2003)

- Les neurones histaminergiques du TMN et la régulation de la vigilance

Dès la découverte que l'histamine était également un neurotransmetteur (Prell et Green 1986), son rôle dans la régulation de l'éveil fut soupçonné. En effet, la somnolence induite par l'utilisation des anti-histaminiques chez l'homme ne fut plus considérée comme un effet secondaire indésirable, mais comme le résultat d'une altération de la transmission histaminergique.

Les substances pharmacologiques provoquant une potentialisation de la transmission histaminergique induisent un éveil (Monnier et coll. 1970; Monti et coll. 1986; Lin et coll. 1988; Lin et coll. 1989; Lin et coll. 1990; Monti et coll. 1991; Lin et coll., 1994; Lin et coll. 1996), alors que les substances altérant la transmission histaminergique (antagonistes des récepteurs histaminergiques centraux, inhibiteurs de la synthèse d'histamine, agonistes des auto-recepteurs H3) augmentent les quantités de sommeil (Kiyono et coll. 1985; Nicholson et coll. 1985; Lin et coll., 1990).

En accord avec le mode de décharge présumé des neurones histaminergiques du TMN, il a également été montré que la libération d'histamine est plus élevée chez les rongeurs durant la phase sombre (période d'activité) que durant la phase claire (Orr et Quay 1975; Mochizuki et coll. 1992). Ainsi, La libération de l'histamine pendant l'éveil permettrait une activation tonique des neurones du thalamus et du cortex cérébral participant ainsi au maintien de l'activité corticale rapide de l'éveil.

Afin de déterminer l'implication fonctionnelle de la transmission histaminergique dans la régulation de l'éveil, Parmentier et Coll., (2002) ont utilisé des souris sélectivement invalidées pour l'histamine décarboxylase (HDC), l'enzyme de synthèse de l'histamine. Ces auteurs ont ainsi démontré une augmentation des quantités de SP (+23%) chez ces souris juste avant l'allumage ou l'extinction des lumières. De plus, ces souris se sont avérées incapables de rester éveillées lorsqu'elles étaient confrontées à un défi comportemental (comme une simulation d'injection intrapéritonéale ou un changement d'environnement).

Ces données suggèrent donc que les neurones histaminergiques seraient impliqués dans la régulation de l'éveil mais également de processus cognitifs. En accord avec cette hypothèse, il a été montré, chez l'homme, que l'histamine est impliquée dans le maintien d'un éveil attentif (Tashiro et coll. 2002) et que les souris invalidées pour les récepteurs H1 à l'histamine présentent un déficit de l'activité exploratoire quand elles sont placées dans un nouvel environnement (Inoue et coll. 1996).

L'ensemble de ces données indique donc que le système histaminergique, de part ses projections diffuses à l'ensemble du névraxe et l'activité électrique des neurones qui le composent, serait un acteur central de la régulation de l'éveil mais également des processus cognitifs associés à cet état (attention….).

VI. Le système hypocrétinergique de l'hypothalamus postérieur

Les neurones histaminergiques représentaient, jusqu'en 1998, l'unique système de régulation de l'EV de l'hypothalamus postérieur. Cependant, la découverte à cette date d'un nouveau peptide appelé oréxine ou hypocrétine (Hcrt), remit en cause cette hypothèse.

A – Anatomie

Le système Hcrt est composé de 2 peptides, l'Hcrt1 (ou oréxine A) et l'Hcrt2 (ou oréxine B) issus d'un seul précurseur (la pré-pro-hypocrétine) et synthétisés par une petite population neuronale localisée exclusivement dans la région périfornicale de l'hypothalamus postérieur (de Lecea et coll. 1998; Peyron et coll., 1998; Sakurai et coll. 1998).

Les neurones à Hcrt envoient des projections à l'ensemble du névraxe (figure 8). Plus particulièrement, une forte densité de fibres Hcrt est présente au niveau de l'hypothalamus lui-même (notamment sur les noyaux arqué, paraventriculaire et ventromédian), du LC, des noyaux du raphé, du TMN, du thalamus paraventriculaire et réticulaire et de la moelle épinière (Peyron et coll., 1998; van den Pol 1999).
Il est connu deux récepteurs à l'Hcrt couplés à des protéines G. A l'instar des projections diffuses du système Hcrt, les 2 récepteurs à l'Hcrt (Hcrt-R1 et Hcrt-R2) se retrouvent de manière diffuse dans l'ensemble du SNC (Trivedi et coll. 1998; Hervieu et coll. 2001; Marcus et coll. 2001).

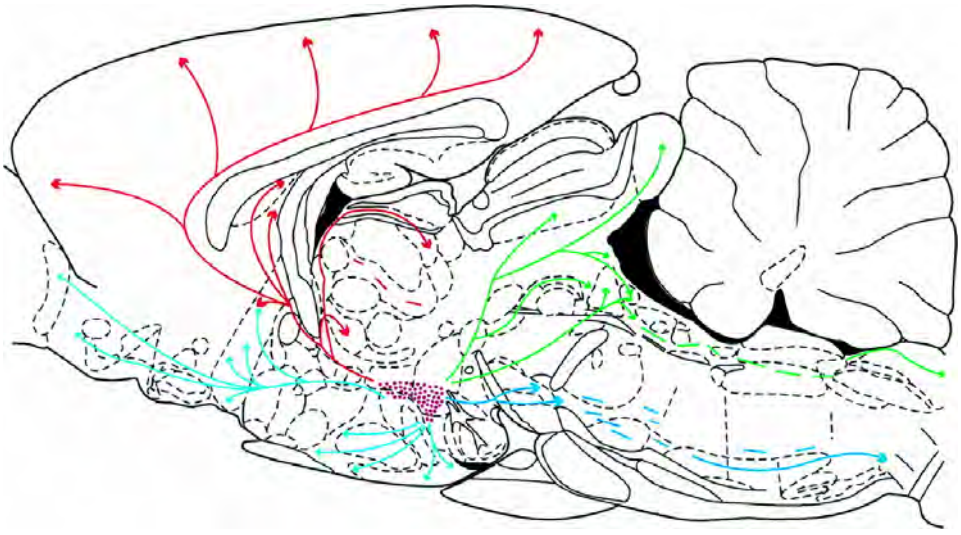


Figure 8 : Représentation schématique des voies anatomiques ayant pour origine les neurones Hcrt (points violets). Les flèches rouges représentent les voies ascendantes dorsales, les flèches turquoises les voies ascendantes ventrales, les flèches vertes, les voies descendantes dorsales et les flèches bleues les voies descendantes ventrales. (D'après (Peyron et coll., 1998).

Alors que les efférences des neurones à Hcrt ont été rapidement décrites, leurs afférences ne furent déterminer que très recement, l'hétérogéneité de l'hypothalamus postérieur limitant la validité des résultats obtenus par des méthodes classiques de traçage de voies.
Néanmoins, une étude récente, utilisant cette méthode à tenté de détermliner les afférences spécifiques des neurones Hcrt (Yoshida et coll. 2006). Cependant, et malgré les vérifications éffectuées par ces auteurs, il est impossible d'affirmer que l'ensemble des régions décrites projette directement et spécifiquement aux seuls neurones Hcrt.

Afin de s'affranchir de ces problèmes de spécificité, une autre étude a utilisé une souris transgénique où le promoteur humain de la pré-pro-hypocrétine est lié à un fragment C-terminal de la toxine tétanique (TTC) et à la GFP (protéine fluorescente). Cette souris a donc pour caractéristique d'exprimer, spécifiquement au sein des neurones à Hcrt, le complexe TTC-GFP qui possède la propriété d'être transporté rétrogradement par les neurones connectés (Sakurai et coll. 2005). Cependant, il existe une limite majeure à la technique utilisée. Il apparaît en effet que la construction utilisée, bien qu'étant un traceur rétrograde sensible, possède également la caractéristique d'être trans-synaptique. Ainsi, les neurones marqués par la GFP peuvent ainsi être des neurones situés à 2 ou 3 synapses des neurones à Hcrt et il apparait pour le moins difficile de considérer ces résultats anatomiques comme représentant uniquement les afférences directes des neurones à Hcrt.

A ce jour, les afférences précises aux neurones à Hcrt ne sont toujours pas connues avec précision, les 2 études citées précedemment n'obtenant pas des résultats totalement similaires :

Afférences communes selon (Sakurai et coll., 2005; Yoshida et coll., 2006)	**Afférence spécifique (Sakurai et coll., 2005)**	**Afférences spécifiques (Yoshida et coll., 2006)**
- Amygdale - Noyau Accumbens - Septum latéral - Région préoptique latérale et médiane - VLPO - Hypothalamus - Cortex infra-limbique et prélimbique - NRD	- Septum latéral - Beb nucleus - Habenula latérale - MnR	- vlPAG et lPAG - VTA - SNR

Tableau 1 : Résumé des principales afférences aux neurones Hcrt.
Abbréviations : **VLP**O : Noyau préoptique ventro-latéral ; **NRD** : Noyau du raphé dorsal ; **MnR** : Raphe médian ; **vlPAG** : substance grise péri-aqueducale ventro-latérale ; **lPAG** : substance grise péri-aqueducale latérale ; **VTA** : aire tégmentale ventrale ; **SNR** : substance noire réticulée

B – Physiologie

Sur la base des données neuroanatomiques, il a été rapidement proposé que l'Hcrt pouvait être impliquée dans la régulation de nombreux fonctions comme la prise alimentaire, la pression artérielle… (Peyron et coll., 1998). De plus, le système Hcrt semble être particulièrement impliqué dans la régulation de états de vigilance. En effet, ces peptides sont fortement impliqués dans une pathologie des états de vigilance, la narcolepsie. Cette pathologie, qui touche 1 personne sur 2000 en Europe, est la seule dont la caractéristique première est une désorganisation des états de vigilance (Bassetti et Aldrich 1996). La narcolepsie se caractérise par un excès de somnolence irrépressible diurne, une tendance à l'apparition anormale de SP (directement depuis l'EV) ,des insomnies et une fragmentation du sommeil nocturne. De plus, la majorité des patients présente également des cataplexies (phases soudaines d'atonies musculaires provoquée par des émotions). Peu après la découverte des Hcrt et de leurs récepteurs, Lin et Coll., (1999) puis Hungs et Coll., (2001) ont montré que des mutations du gène du récepteur Hcrt-R2 étaient associées à des phénotypes de narcolepsie-cataplexie chez 3 espèces canines. Ce phénotype narcolepsie-cataplexie a ensuite été décrit chez des souris présentant une invalidation du gène de la pré-pro-Hcrt (Chemelli et coll. 1999) et chez des

souris dont les neurones Hcrt ont été détruits (Hara et coll. 2001). Chez l'homme, il est observé une disparition totale des neurones à Hcrt chez les patients narcoleptiques-cataplectiques (Peyron et coll. 2000). Les projections denses du système Hcrt à conduit à l'hypothèse que l'Hcrt régulerait les états de vigilance, et plus particulièrement l'EV, en modulant l'activité des systèmes monoaminergiques et cholinergiques. Ainsi, l'injection intracérébroventriculaire ou au sein du LC d'Hcrt-1 induit une forte augmentation des quantités d'EV qui se produit au détriment des quantités de SP (Hagan et coll. 1999; Bourgin et coll. 2000). De plus, l'effet éveillant obtenu suite à l'injection d'Hcrt-1 dans les ventricules latéraux est bloqué par l'administration systémique d'antagonistes des récepteurs H1 de l'histamine (Yamanaka et coll. 2002). Cet effet éveillant de l'Hcrt est également absent chez les souris invalidées pour les récepteurs H1 de l'histamine (Huang et coll. 2001). Ainsi, l'Hcrt permettrait le maintien de l'EV en agissant de manière globale sur l'ensemble des systèmes d'EV. En accord avec cette hypothèse, il a été montré, *in-vitro*, que l''Hcrt stimulait fortement la fréquence de décharge des neurones NA du LC (Hagan et coll., 1999; Horvath et coll. 1999), dopaminergiques de l'aire tégmentale ventrale (Nakamura et coll. 2000), 5-HT du NRD (Brown et coll. 2001; Liu et coll. 2002), histaminergique du TMN (Bayer et coll. 2001; Eriksson et coll. 2001) et cholinergiques du LDT (Burlet et coll. 2002).

L'utilisation du marqueur d'activité neuronale C-Fos, permit également la mise en évidence de l'activation des neurones à Hcrt suite à un EV actif prolongé ou suite à un traitement à base de psychostimulants (amphétamines ou modafinil) (Torterolo et coll. 2003).

Ainsi, les neurones à Hcrt semble présenter une activité électrophysiologique corrélée à la survenue des épisodes d'EV avec une forte activation durant l'EV actif. Cette hypothèse a été très récemment confirmée par l'enregistrement de l'activité électrophysiologique de neurones identifiés comme Hcrt chez le rat vigile en contention (figure 10, (Lee et coll. 2005).

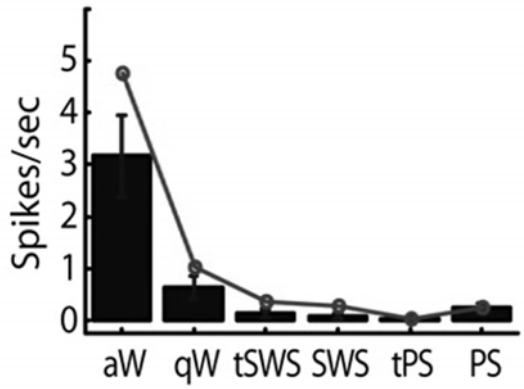


Figure 10 : Fréquence moyennne de décharge des neurones Hcrt chez le rat vigile en contention. Ces neurones sont plus actifs durant l'EV actif (aW) que durant l'EV calme (qW). Ils diminuent leur fréquence de décharge durant le sommeil. (D'après (Lee et coll., 2005).

A la vue de cette étude, le rôle premier des neurones Hcrt semble être la régulation de l'EV, et plus particulièrement de l'EV actif.

Cependant, l'enregistrement de l'activité électrique des neurones Hcrt chez l'animal libre de se mouvoir complexifia cette hypothèse (Mileykovskiy et coll. 2005). En effet, les neurones Hcrt présentent une augmentation de leur fréquence de décharge lors de la présentation d'un stimulus externe (déclenchement d'un son…), lors de comportements exploratoires, de la prise de nourriture…. (figure 11) :

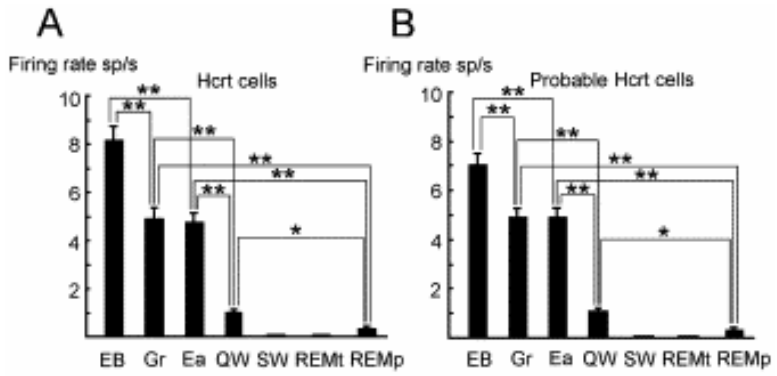


Figure 11: Fréquence de décharge de neurones identifiés comme hypocrétinergiques chez le rat : EB : comportement exploratoire ; Gr : toilettage ; Ea : consommation d'un aliment ; QW : EV calme, SW : SL ; REMt : SP ; REMp : activation musculaires phasiques durant le SP. (D'après (Mileykovskiy et coll., 2005).

Le rôle des neurones à Hcrt va au-delà de la seule régulation de la vigilance. De par leurs afférences/efférences et leur activité électrophysiologique, les neurones Hcrt semblent impliqués dans la régulation de l'EV, mais également dans certains processus cognitifs associés à cet état.

VII. Conclusion

L'éveil est donc un état complexe, nécessitant l'activation simultanée de nombreuses structures interconnectées (figure 12) dont aucune n'est indispensable à la genèse de cet état:

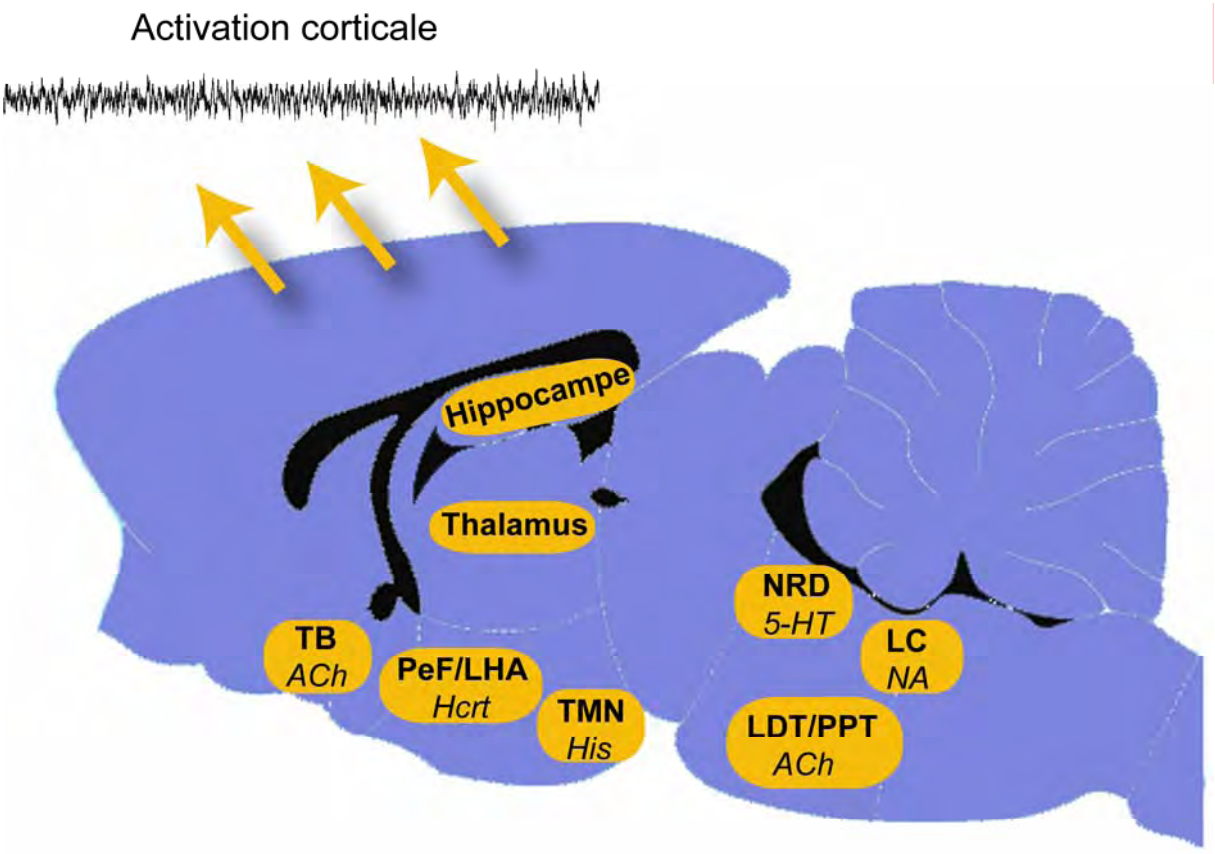


Figure 12 : Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rat indiquant les structures anatomiques impliquées dans l'EV et l'activation corticale caractéristique de cet état.

Structures et mécanismes de régulation du sommeil lent

La découverte du "système d'éveil" au niveau de la formation réticulée mésencéphalique et la théorie réticulaire éliminait toute théorie active du sommeil. Celui-ci était expliqué, en vertu du "Principe d'économie" : Le sommeil lent (SL) apparaissait ainsi comme un phénomène purement passif, l'endormissement et la diminution des perceptions sensorielles n'étant dus qu'à la diminution d'activité des systèmes d'EV.
On sait aujourd'hui que la genèse et le maintien du SL, loin d'être un phénomène passif, mettent en jeux des réseaux neuronaux spécifiques.

I. La région préoptique

Le rôle de la région préoptique dans la régulation du SL a été reportée pour la première fois par Von Economo (1931). Ce dernier avait mis en évidence que les patients atteints de grippe espagnole et présentant une lésion de l'hypothalamus antérieur devenaient insomniaques. Von Economo appela donc cette région *Schlafzentrum* (centre du sommeil en allemand). Cette hypothèse fut confirmée par la suite chez l'animal, grâce à l'utilisation de multiples techniques de lésion. Ainsi, une lésion de tout l'hypothalamus antérieur incluant la région préoptique induit des éveils prolongés, suivis par un état comateux et enfin la mort de l'animal (Nauta 1946). Par la suite, des lésions électrolytiques (McGinty et Sterman 1968), et chimiques à l'acide kaïnique (Szymusiak et McGinty 1986) ou à l'acide iboténique (Sallanon et coll. 1989) restreintes à la région préoptique chez le chat, ont été suivies d'une détérioration de l'architecture du cycle veille-sommeil avec une disparition parfois totale du SL.
Une étape clé fut franchie en 1996 avec la mise en évidence de la région préoptique ventrolatérale (VLPO) (Sherin et coll. 1996). Ces auteurs ont utilisé l'immunohistochimie du C-Fos (utilisé comme marqueur d'activité cellulaire) chez des rats présentant de grandes quantités de SL avant le sacrifice. Ils ont ainsi mis en évidence de nombreux neurones activés (C-Fos+) au sein de la région préoptique, avec une plus forte densité dans le VLPO. (Sherin et coll., 1996). De plus, le nombre des neurones C-Fos+ au sein du VLPO était corrélée aux quantités de SL précédant le sacrifice.
Ainsi, le VLPO semblerait contenir une forte quantité de neurones dont l'activité est spécifique au SL. Ces résultats ont été confirmés par des enregistrements

électrophysiologiques des neurones de la région préoptique au cours des états de vigilance. Ainsi, le VLPO contient la majorité des neurones SL-on de l'aire préoptique (figure 13). De plus, ces neurones, qui ont la particularité de décharger très fortement à la transition EV-SL, présentent une fréquence de décharge proportionnelle à l'intensité et à la durée des épisodes de SL (Szymusiak et coll. 1998). Il est également intéressant de noter que la fréquence de décharge de ces neurones est inverse de celle des neurones monoaminergiques de l'EV.

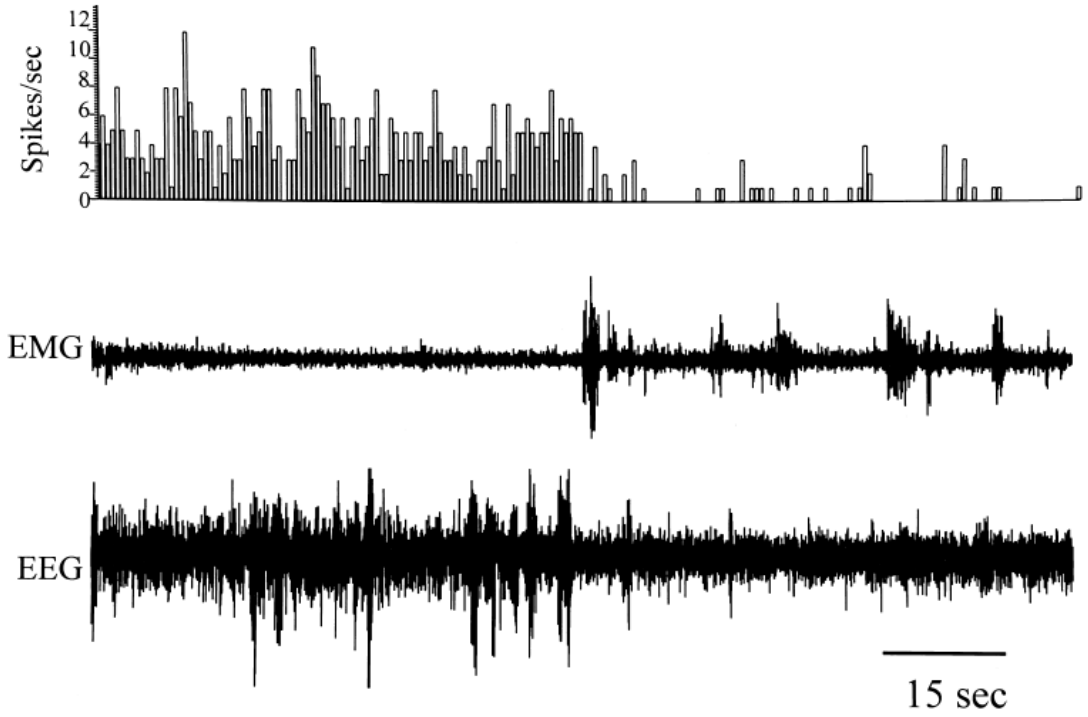


Figure 13 : Activité spontanée d'un neurone du VLPO au cours du SL et de l'EV. (D'après (Szymusiak et coll., 1998)

L'ensemble de ces données suggère donc que le VLPO représenterait la zone de contrôle du SL au sein de la région préoptique. Cette hypothèse fut confirmée récemment. Il a en effet été montré que la lésion bilatérale spécifique du VLPO est suivie d'une longue et forte insomnie chez le rat (avec une réduction de plus de 50% des quantités de SL) (Lu et coll. 2000).

Les études de tracage rétrograde et antérograde ont montré que le VLPO était réciproquement connecté avec les structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'EV, tel que le TMN, le NRD, le LC, le complexe LDT-PPT et la PeF/LHA (Luppi et coll., 1995; Sherin et coll., 1996; Sherin et coll. 1998; Gervasoni et coll., 2000; Steininger et coll. 2001).

Enfin, 90% des neurones du VLPO expriment la Galanine et/ou le GABA.

Ainsi, les neurones du VLPO, vraisemblablement SL-on, pourraient être à l'origine de l'inhibition des neurones monoaminergiques de l'EV durant le SL.

La densité des neurones SL-on au sein du VLPO permit leur étude par des techniques *in-vitro*. Ainsi, Gallopin et coll., (2000) ont démontré que 80% des neurones du VLPO étaient inhibés par la NA et l'ACh mais que l'Hist et l'Hcrt n'avait pas d'effet sur la décharge de ces neurones (figure 14) :

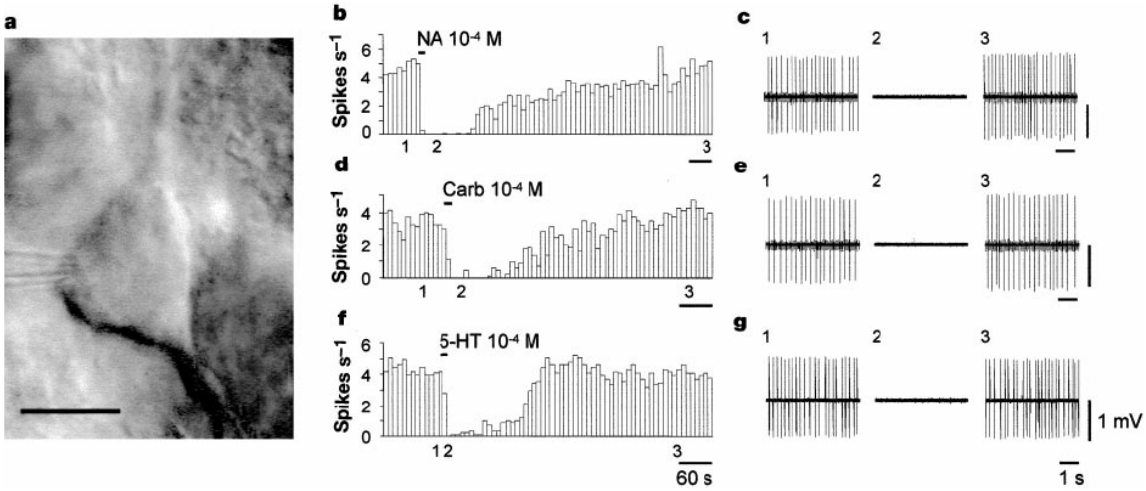


Figure 14 : Inhibition d'un neurone LTS du VLPO (présumé SL-on) par les principaux neurotransmetteurs de l'EV. (D'après (Gallopin et coll., 2000)

De plus, ces auteurs ont montré que ces neurones représentaient une population homogène au sein du VLPO, étant tous GABAergiques, de forme triangulaire et avec la particularité électrophysiologique de présenter un potentiel calcique de bas seuil (low threshold calcium spike, LTS, figure 15).

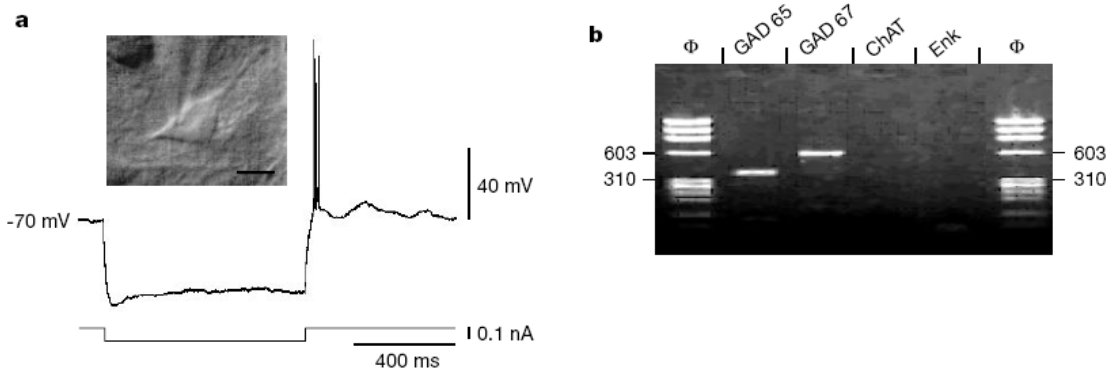


Figure 15 : Les neurones LTS, caractérisés d'après leurs propriétés électrophysiologiques et leurs réponses aux neurotransmetteurs de l'EV (a) sont de types GABAergiques (b). (D'après (Gallopin et coll., 2000)

Ainsi, ces neurones LTS du VLPO enregistrés *in-vitro* semblaient correspondre aux neurones SL-on enregistrés *in-vivo* au sein de cette structure. Il existerait une interaction inhibitrice

réciproque entre le VLPO et les centres monoaminergiques de l'EV, nécessaire à l'endormissement puis au déclenchement du SL proprement dit.
Cependant, la relation VLPO/centres monoaminergiques de l'EV n'est pas si simple. Il a en effet été montré que les neurones LTS, inhibés par la NA et l'ACh, répondaient de manière différente à la 5-HT. Ainsi, 47% des neurones LTS sont également inhibés par la 5-HT (LTS type 1) alors que 53% de ces neurones sont excités (LTS type 2) (Gallopin et coll. 2002). Il existerait donc 2 types de neurones SL-on au sein du VLPO. La 5-HT pourrait participer de façon active à l'endormissement par l'activation des neurones LTS type 2 du VLPO, cette hypothèse relançant le débat sur le rôle de la 5-HT dans la mise en place du sommeil.

L'inhibition réciproque VLPO/centres monoaminergiques de l'EV n'est cependant pas suffisante pour expliquer de manière satisfaisante l'alternance EV-SL. En effet, des mécanismes homéostatiques interviennent également dans la régulation du SL : Cette homéostasie du sommeil expliquerait le rebond de SL consécutif à sa privation et serait médiée par des substances dites hypnogènes, qui s'accumulerait durant l'EV. Parmi ces substances hypnogènes, les prostaglandines D2 (PGD2) et l'adénosine (ADO) apparaissent primordiales pour la régulation du sommeil (Hayaishi 2002). Ainsi, ces deux substances devraient moduler, et plus particulièrement exciter, les neurones LTS du VLPO. Il a cependant été reporté que les PGD2 n'avaient pas d'effets sur les neurones LTS du VLPO (Gallopin et coll. 2005). Cependant, ces mêmes auteurs ont démontré un effet différentiel de l'ADO sur les neurones LTS du VLPO. Si de manière générale, l'ADO inhibe les 2 types de neurones LTS par le biais de récepteurs A1, elle a un effet excitateur par le biais des récepteurs A2a. Or, seuls les neurones LTS de type 2 expriment les récepteurs A2a et peuvent donc être excités par l'ADO (Gallopin et coll., 2005). Ainsi, les neurones LTS de type 2 pourraient détecter l'augmentation des quantités d'ADO au cours de l'EV et préparer de ce fait l'endormissement.

En conclusion, le rôle du VLPO dans la genèse et le maintien du SL semble bien établi : il existerait une interaction inhibitrice réciproque entre les neurones du VLPO et les neurones monoaminergiques de l'EV. De plus, la 5-HT et l'ADO semblent jouer un rôle central dans les processus d'endormissements, en allant exciter précocément les neurones LTS de type 2.

II. Le noyau réticulé thalamique et les interactions thalamo-corticales

Ces structures thalamiques n'interviennent pas dans la genèse du SL, mais sont à l'origine de la synchronisation corticale caractéristique de cet état. En effet, lors du SL, l'EEG est caractérisé par la présence d'oscillations lentes (rythme delta, de 0,5 à 4 Hz) et de fuseaux (de 10 à 14 Hz).

Les ondes lentes observées au cours du SL seraient générées en partie au niveau du cortex. Il a en effet été montré une persistance de ces oscillations suite à une lésion du thalamus (Villablanca 1974; Steriade et coll. 1993) alors qu'elles sont abolies au sein du thalamus d'animaux ayant subi une décortication (Timofeev et Steriade 1996), ou lorsque les connections intra-corticales sont détruites (Amzica et Steriade 1995). Tous les types de neurones corticaux présentent ces oscillations lentes avec les mêmes caractéristiques (figure 16): ils déchargent durant la phase de dépolarisation qui est associée à la composante négative de l'EEG et sont silencieux durant la phase d'hyperpolarisation correspondant à la composante positive de l'EEG (Steriade 2000; Timofeev et coll. 2001) :

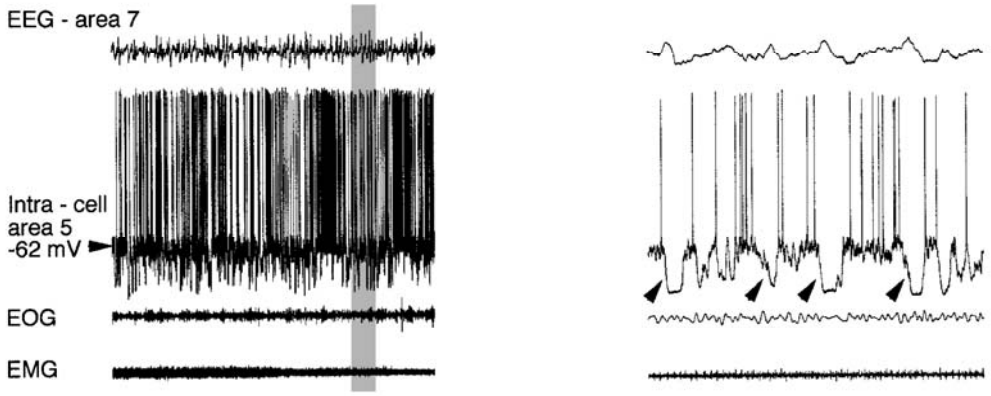


Figure 16 : Enregistrement intracellulaire d'un neurone cortical au cours du SL naturel chez le chat. La partie de droite représente un agrandissement de la partie grisée. Notez les hyperpolarisations cycliques de ce neurone au cours du SL. (D'après (Timofeev et coll., 2001)

Les oscillations lentes observées au niveau de l'EEG seraient le reflet de la sommation de ces hyperpolarisations cycliques au niveau cortical.

De plus, ces oscillations ne se retrouvent pas seulement au niveau du cortex. Il a été en effet mis en évidence que la décharge des neurones corticaux-thalamiques durant leur phase

dépolarisée provoque une synchronisation des neurones thalamiques (Contreras et Steriade 1997; Contreras et Steriade 1997). Cette synchronisation thalamo-corticale serait de plus à l'origine des fuseaux caractéristiques du SL.

Ces fuseaux seraient générés au niveau du noyau réticulé du thalamus (RE), composé principalement de neurones GABAergiques. En effet, il a été montré que les fuseaux disparaissent de l'EEG lorsque le RE est déconnecté du reste du thalamus (Steriade et coll. 1985; Pare et coll. 1987) alors qu'ils sont toujours présents au sein de ce noyau (Steriade et coll. 1987). Or ces neurones ne projettent pas directement aux cortex, mais aux neurones thalamocorticaux, principalement de type glutamatergique, qui projettent eux directement au cortex. Ainsi, le RE serait à l'origine de l'inhibition rythmique des neurones corticaux, par l'intermédiaire de neurones thalamocorticaux. D'un point de vue fonctionnel, la genèse des fuseaux par les neurones réticulés thalamiques aurait pour conséquence le blocage de la transmission vers le cortex des informations sensorielles par les neurones relais du thalamus, permettant ainsi la « déafférentation » du cortex durant le SL (McCormick et Feeser 1990).

III. Conclusion

L'apparition du SL résulterait ainsi de l'inhibition des centres monoaminergiques de l'EV par le VLPO. Cette inhibition des centres de l'EV permettrait la desinibition du RE et l'apparition des fuseaux, mais également mise en place des oscillations lentes (rythme delta) au niveau du cortex (figure 17).

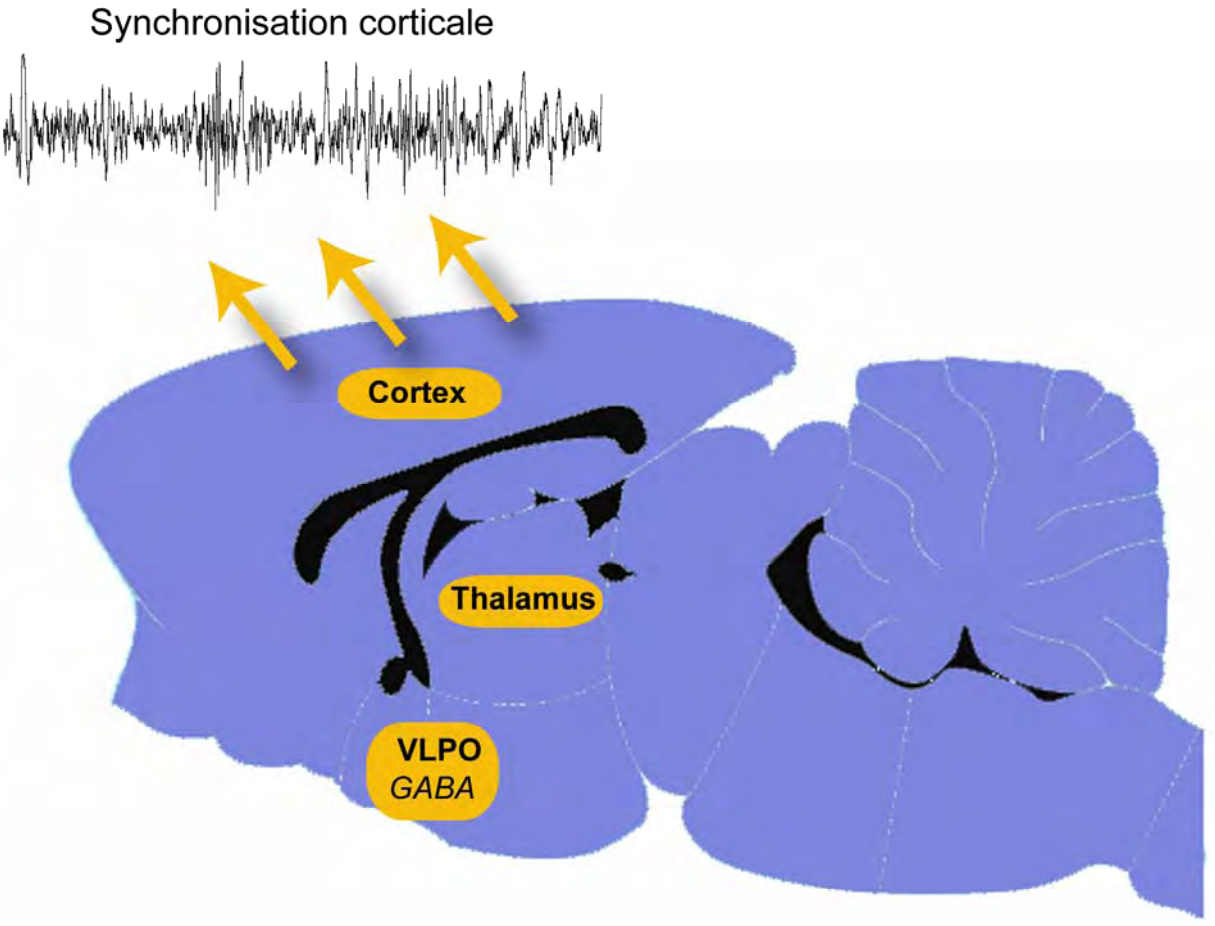


Figure 17 : Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rat indiquant les structures anatomiques impliquées dans la genèse du SL et des oscillations lentes caractéristiques de cet état.

Structures et mécanismes de régulation du sommeil paradoxal

Les phases de SP sont caractérisées chez l'homme comme chez l'animal par des phénomènes toniques et phasiques. L'apparition de ces phénomènes résulte de l'activation de différentes populations de neurones. Les premiers travaux réalisés afin de localiser les systèmes neuronaux responsables de l'apparition du SP ont consisté à effectuer des sections transversales à différents niveaux du cerveau chez le chat, et à observer quelles étaient les parties capables de conserver la capacité à générer le SP (Jouvet et Michel 1959; Jouvet 1962; Jouvet 1965).

Il en a été déduit que le déclenchement du SP est assuré par des structures restreintes au tronc cérébral inférieur. En effet, sur la préparation dite « chat pontique », où les structures cérébrales en avant du tronc cérébral sont aspirées, il est possible d'observer la survenue d'épisodes de SP avec un rythme ultradien régulier (figure 18).

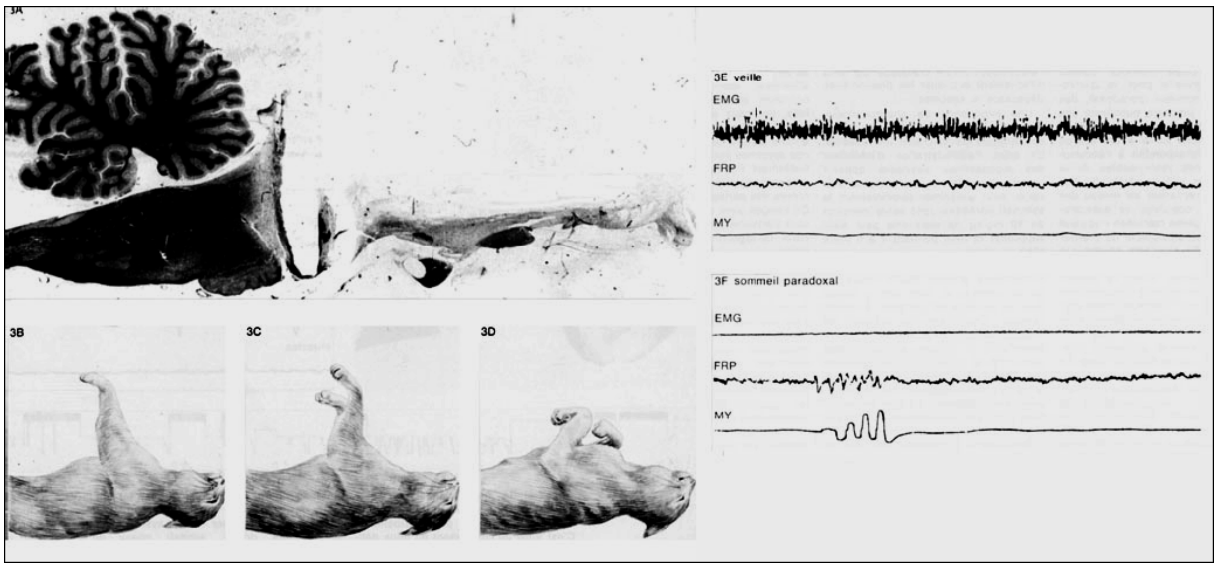


Figure 18: modèle expérimental du chat pontique. Une section est réalisée au niveau intercolliculaire isolant le cerveau antérieur du tronc cérébral. Les régions rostrales au pont sont ensuite aspirées. L'animal présente alors un état d' « éveil », caractérisé par une importante activité musculaire (EMG, en haut) et la désynchronisation des ondes enregistrées dans la formation réticulée pontique (FRP, en haut), en alternance avec un état de « sommeil paradoxal » caractérisé par l'absence de tonus musculaire (EMG, en bas), et l'apparition simultanée d'ondes pontiques phasiques (FRP, en bas) corélées aux mouvements des yeux (MY, en bas). (D'après Jouvet 1962).

I. Le noyau sublatéro-dorsal

A – Anatomie

Le noyau sublatéro-dorsal (SLD), appelé péri-LC-alpha chez le chat, est localisé dans la partie dorsale de la formation réticulée pontique, ventralement au LC. Afin de clarifier nos propos, nous emploierons, dans la suite de ce chapitre, le terme SLD afin de caractériser cette région, que ce soit chez le rat ou le chat. Cette structure envoie des projections ascendantes vers d'autres régions du tronc cérébral, telle la substance grise périaqueducale et le NRD, mais aussi vers les structures de l'hypothalamus postérieur et le thalamus (Boissard 2002), sous-tendant son rôle dans l'activation corticale spécifique du SP. Les projections descendantes du SLD sont destinées en majorité vers les structures bulbaires relais de l'atonie musculaire (Boissard 2002). Les voies nerveuses afférentes au SLD proviennent rostralement de l'aire motrice primaire du cortex frontal, du noyau central de l'amygdale, du télencéphale basal et de l'hypothalamus postérieur (Boissard et coll. 2003). Au niveau mésencéphalique, le SLD reçoit de denses projections en provenance de la PAG rostrale et ventro-latérale, ainsi que du noyau profond du mésencéphale (Boissard et coll., 2003). Les parties orale et caudale de la formation réticulée pontique, la formation réticulée parvocellulaire du bulbe rachidien et le noyau paragigantocellulaire latérale présentent également de nombreux neurones afférents au SLD (Boissard et coll., 2003).

B – Physiologie

Le SLD joue un rôle clé dans le déclenchement et le maintien du SP. En effet, la lésion bilatérale du complexe coéruléen, incluant le SLD chez le rat (Roussel et coll. 1976), comme chez le chat (LCα et péri-LCα) (Sastre et Jouvet 1979), est suivie d'une très forte diminution, voire d'une disparition, du SP. La lésion électrolytique (Jouvet 1965; Roussel et coll. 1967) ou chimique (Sastre et Jouvet 1979), restreinte au SLD supprime elle, exclusivement l'atonie musculaire pendant les phases de SP. Chez de tels animaux, la levée de l'inhibition motrice au cours des phases de SP a permis d'observer des « comportements oniriques », suggérant un rôle du SLD dans la genèse de l'atonie musculaire spécifique du SP. L'enregistrement électrophysiologique de cette région chez le chat comme chez le rat a révélé la présence de

neurones présentant une activation tonique sélective des phases de SP, c'est-à-dire de neurones SP-on (Sakai et coll. 1981; Boissard 2002).
Chez le chat, il a été montré que l'injection d'un agoniste cholinergique (carbachol) au sein du SLD induit un état comparable au SP naturel (George et coll. 1964; Morales et coll. 1987; Baghdoyan et coll. 1989; Vanni-Mercier et coll. 1989). En revanche, l'injection d'atropine, un antagoniste sélectif des récepteurs muscariniques suppriment le SP induit par le carbachol (Vanni-Mercier et coll., 1989; Yamamoto et coll. 1990), suggérant que l'induction de SP serait médiée par les récepteurs muscariniques, et plus particulièrement les récepteurs M3 (Sakai et Onoe 1997). Vanni-Mercier et Coll., (1989) ont déterminé que la zone cholinoceptive effectrice correspond au SLD. De plus, l'injection d'acide kaïnique (un agoniste glutamatergique non-NMDA) au sein du SLD provoque l'apparition de SP chez le chat vigile (Onoe et Sakai 1995).
Enfin, des études électrophysiologiques ont montré que tous les neurones SP-on du SLD sont excités par le glutamate (Sakai et Koyama 1996) alors que le carbachol peut avoir un effet excitateur ou inhibiteur sur ces neurones (Sakai et Koyama 1996).
L'ensemble de ces résultats indique que l'acétylcholine, mais aussi le glutamate, jouent un rôle important dans les mécanismes exécutifs du SP via leur action sur les neurones du SLD.

Cependant, chez le rat, l'effet du carbachol sur les quantités de SP semble moins clair. En effet, plusieurs auteurs injectant du carbachol par pression ont observé des augmentations des quantités de SP bien plus modestes que l'effet physiologique obtenu chez le chat (Gnadt et Pegram 1986; Bourgin et coll. 1995). Ces résultats peuvent être nuancés par une étude évaluant l'effet de l'injection de carbachol dans 112 sites pontiques sur 70 animaux (Deurveilher et coll. 1997). Sur les 151 injections réalisées, seules 20 résultent en une augmentation significative des quantités de SP. Plus récemment, une éjection micro-iontophorétique de carbachol dans le SLD sur le modèle du rat vigile en contention a montré une augmentation des quantités d'éveil (Boissard et coll. 2002).
De plus, les neurones SP-on du SLD ne présentent pas de modifications de leur fréquence de décharge suite à l'injection iontophorétique de carbachol, alors qu'ils sont excités par l'acide kaïnique (figure 19):

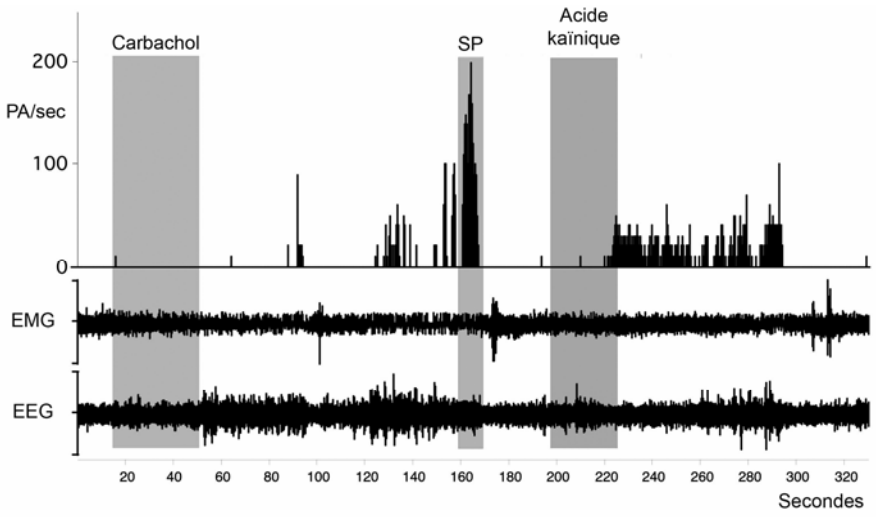


Figure 19: Les neurones SP-on du SLD ne sont pas activés par le carbachol alors que l'injection iontophorétique d'acide kaïnique induit une forte augmentation de leur fréquence de décharge. (D'après (Boissard 2002).

En revanche, l'application de bicuculline ou de gabazine, deux antagonistes des récepteurs GABA-A, ou d'acide kaïnique induit de manière rapide et robuste un état proche du SP, baptisé *SP-like* (figure 20, (Boissard et coll., 2002). Cet état se caractérise par une atonie musculaire continue, un EEG de faible amplitude, désynchronisé, et une augmentation du seuil de réactivité aux stimulations extérieures ; Il se distingue du SP physiologique par l'absence de phénomènes phasiques comme les saccades oculaires et les érections péniennes (Boissard et coll., 2002) :

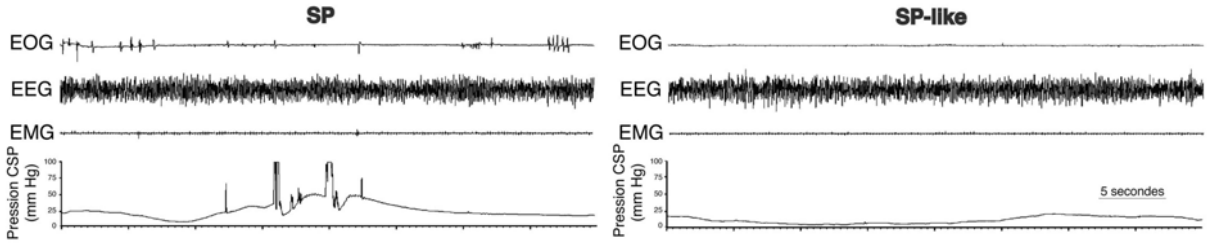


Figure 20: Le *SP-like* obtenu par l'injection iontophorétique de bicuculline au sein du SLD est caractérisé par l'absence des mouvements phasiques caractéristiques du SP : les mouvements oculaires (EOG) et les érections péniennes (trace du bas). (D'après (Boissard 2002).

L'ensemble de ces données suggère que le SLD contient une population de neurones cruciale dans le déclenchement du SP, en particulier dans ses phénomènes toniques principaux que sont l'atonie musculaire et la désynchronisation corticale. En outre, ces résultats indiquent, tout du moins chez le rat, que des mécanismes de deshinibition GABAergique et d'excitation glutamatergique jouent un rôle primordial dans le déclenchement du SP.

II. Les noyaux gigantocellulaires du bulbe rachidien

Il est connu que les motoneurones crâniens et spinaux sont hyperpolarisés durant le SP (figure 21), induisant de ce fait l'atonie musculaire caractéristique de cet état (Chase et coll. 1980).
Ainsi, l'atonie musculaire du SP serait un phénomène actif, résultant de l'activation de neurones inhibiteurs projetant aux motoneurones spinaux (Chase et coll. 1984).

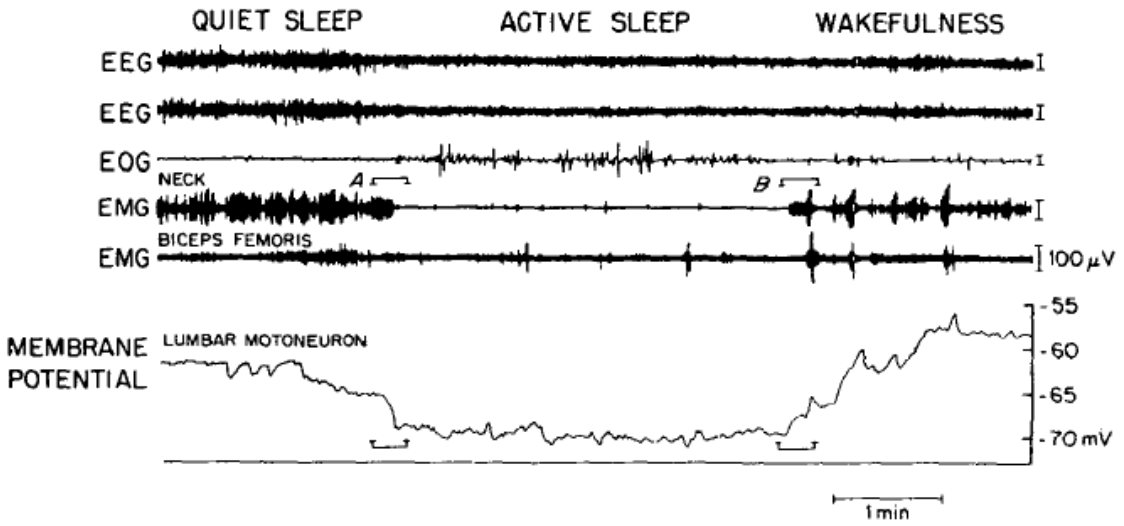


Figure 21: Enregistrement intracellulaire d'un motoneurone spinal au cours des états de vigilance chez le chat. Notez que l'hyperpolarisation des motoneurones spinaux débute avant la phase de SP proprement dite. (D'après (Chase et Morales 1990).

Comme décrit précédemment, le centre de commande pontique de l'atonie est représenté par le SLD. Cependant, l'action inhibitrice de cette structure sur les motoneurones spinaux n'est pas directe. Elle fait relais dans le noyau gigantocellulaire ventral (GiV ; appellé également noyau réticulé magnocellulaire ou Mc) par la voie tegmento-réticulée latérale (Hancock et Fougerousse 1976; Sakai et coll. 1979).
Il a été enregistré dans le GiV du chat au cours du cycle veille-sommeil des neurones dont l'activité est spécifique aux périodes d'atonie musculaire, ces neurones répondant à une stimulation antidromique de la voie réticulo-spinale ventro-latérale (Sakai et coll. 1979; Kanamori et coll. 1980; Sakai et coll., 1981). L'ensemble de ces observations indique que cette région du bulbe rachidien contient des neurones de type SP-on se projetant sur la moelle épinière, à l'origine de l'inhibition des motoneurones spinaux. Ces résultats sont ainsi en accord avec des données anciennes qui avaient déjà montré que la stimulation électrique du GiV inhibe l'activité motrice initiée par réflexe chez le chat décérébré (Magoun et Rhines 1946)

A l'aide de techniques de traçage antérograde des voies nerveuses, il a été mis en évidence une projection du GiV vers les neurones de la zone intermédiaire de la moelle épinière (Holstege et Kuypers 1982). Chez le rat, il a été observé par microscopie électronique que le GiV projetait de manière monosynaptique sur les motoneurones thoraciques (Holstege et Bongers 1991). Les motoneurones crâniens reçoivent également des projections directes de ces neurones bulbaires chez le chat (Fort et coll. 1990) comme chez le rat (Rampon et coll. 1996).

Les afférences au GiV décrites par traçage rétrograde chez le chat proviennent de l'ensemble du cerveau (Luppi et coll. 1988). Au niveau télencéphalique, des neurones rétrogradement marqués sont observés principalement dans la région préoptique, le noyau de l'amygdale centrale, et les aires dorsale, latérale et postérieure de l'hypothalamus. Le GiV reçoit la majorité de ses informations des régions du tronc cérébral, telles la substance grise périaqueducale, la formation réticulée mésencéphalique, les noyaux du raphé, et surtout le SLD (Luppi et coll., 1988).

L'application locale dans le GiV d'acétylcholine ou de ses agonistes ne provoque pas d'atonie posturale (Vanni-Mercier et coll., 1989). En revanche, l'injection de glutamate dans cette même structure induit chez le chat décérébré une atonie des muscles de la nuque (Lai et Siegel 1988). En accord avec ces données, des études de microdialyse in vivo ont permis de détecter une augmentation de glutamate, et non d'acétylcholine, dans le GiV au cours du SP (Kodama et coll. 1992; Kodama et coll. 1998). Le contrôle de cette région bulbaire se ferait donc par une voie glutamatergique en provenance du SLD.

Enfin, la voie GiV/motoneurones spinaux ne serait pas de nature GABAergique, mais plus vraisemblablement de nature glycinergique, comme en témoigne l'immunohistochimie de la glycine réalisée chez le chat (Fort et coll. 1990) et chez le rat (Rampon et coll. 1996).

III. Noyaux paragigantocellulaires du bulbe rachidien

Le noyau paragigantocellulaire dorsal (DPGi) et plus ventralement le noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi) se situent dans le bulbe rachidien. Le LPGi a été décrit comme une afférence excitatrice majeure du LC (Aston-Jones et coll., 1986; Aston-Jones et coll. 1991). La stimulation électrique du LPGi provoque l'excitation de 73% des neurones du LC enregistrés, alors que 16% des neurones du LC sont inhibés (Ennis et Aston-Jones 1988). L'excitation évoquée est bloquée par le kynurénate, un antagoniste des récepteurs

glutamatergiques, alors que l'inhibition est antagonisée par l'idazoxan, un antagoniste des récepteurs adrénergiques (Ennis et Aston-Jones 1988; Astier et coll. 1990). Néanmoins des neurones glycinergiques (Rampon et coll. 1999), GABAergiques (Peyron 1996; Verret 2005) et cholinergiques (Verret et coll. 2005) ont été décrits au sein du LPGi, suggérant la complexité de cette structure. De plus, ces neurones du LPGi, vraisemblablement SP-on, seraient en partie sous le contrôle excitateur du SLD. En effet, suite à l'injection de bicuculline au sein du SLD induisant un état proche du SP, Boissard et Coll., ont reporté la présence de nombreux neurones C-Fos (donc activés suite à l'injection pharmacologique) particulièrement au niveau du LPGi. De plus, lorsque ces auteurs couplent cette immunohistochimie du C-Fos à celle de la PHA-L (traceur antérograde mettant en évidence les efférences du SLD), ils observent un grand nombre de fibres antérogradement marquées au contact des neurones C-Fos du LPGi (Boissard et coll., 2002).

Le DPGi contient des neurones vraisemblablement GABAergiques (Emilie Sapin, communication personnelle) qui projettent densément au LC (Luppi et coll., 1995) et qui seraient impliqués dans l'inhibition de cette structure durant le SP. En accord avec cette hypothèse, un grand nombre de neurones du DPGi projetant au LC expriment également la protéine Fos suite à un rebond de SP (Verret et coll., 2006).

IV. La substance grise périaqueducale

La substance grise périaqueducale (PAG) est formée de trois colonnes de cellules s'étendant rostro-caudalement et est impliquée dans de très nombreux processus physiologiques. Ses parties latérale et ventrolatérale reçoivent des informations en provenance de structures limbiques et végétatives, impliquées dans des réponses comportementales intégratives opposées (Hamilton 1973; Keay et Bandler 2001) : ainsi la colonne latérale est à l'origine de réactions comportementales actives, son activation induisant des comportements de défense, de fuite, de combat, mais également une hypertension et une tachycardie (Keay et Bandler 2001). Parallèlement, la colonne ventrolatérale est impliquée dans les réponses passives, son activation entraîne alors une immobilité, une hyporéactivité, un état de quiescence, accompagné d'hypotension et de bradycardie (Keay et Bandler 2001).
Par ailleurs, son rôle dans la régulation de la vigilance a déjà été suggéré. En effet, il a été montré chez le chat que la lésion électrolytique de la vlPAG à la jonction ponto-

mésencéphalique est suivie d'une augmentation de SP durant 4 à 5 jours (Petitjean et coll. 1975). De plus, l'éjection dans la même zone de muscimol, un agoniste des récepteurs $GABA_A$ entraîne de façon réversible une hypersomnie en SP chez le chat (Sastre et coll. 1996) et le rat (Boissard 2002; Lapray 2005). Ces données suggèrent l'existence dans la vlPAG d'une population de neurones répresseurs vis à vis du SP. Plus récemment, Boissard et coll. (2003) ont étudié les projections afférentes du SLD en couplant le traçage rétrograde par la CTb à l'immunohistochimie de l'acide glutamique décarboxylase (GAD), l'enzyme de synthèse du GABA. En accord avec des résultats antérieurs (Semba 1993), seules la partie ventro-latérale de la substance grise périaqueducale (vlPAG) et la formation réticulée adjacente (DpMe) sont à l'origine de projections GABAergiques denses vers le SLD (Boissard et coll. 2003). Des données fonctionnelles récentes soutiennent l'idée que la vlPAG et le DpMe sont à l'origine de l'inhibition du centre exécutif du SP durant l'éveil et le SL. Ainsi, Verret et coll., (2005) ont cartographié les neurones actifs chez des rats privés de SP pendant 72-h. Dans ces conditions expérimentales, ces auteurs ont notamment observé un grand nombre de neurones immunoréactifs à la protéine Fos (Fos+) dans la vlPAG. Des doubles marquages immunohistochimiques Fos/GAD ont de plus permis de mettre en évidence qu'une partie de ces neurones est de type GABAergique (Emilie Sapin, communication personnelle). En revanche, une proportion importante des neurones Fos+ dans la vlPAG ne sont pas de nature GABAergique. Ces neurones, potentiellement de nature glutamatergique, constitueraient une voie excitatrice vers les structures de l'éveil, parallèle à la voie GABAergique inhibitrice vers le SLD.

De plus, il a été mis en évidence, au sein de la vlPAG, des neurones GABAergiques projetant au LC et au NRD (Luppi et coll. 1999; Gervasoni et coll., 2000). Plus récemment, Verret et Coll., ont montré qu'une faible proportion des neurones de la vlPAG projetant au LC étaient également C-Fos+ suite au rebond de SP (Verret et coll., 2006), suggérant que la vlPAG pourrait également participer à l'inhibition des centres aminergiques de l'éveil pendant le SP.

La vlPAG, de par ses connexions avec les centres de l'éveil et le centre exécutif du SP, sa situation anatomique à l'interface entre les voies limbiques et périphériques et ses propriétés intégratives des informations végétatives, somato-sensorielles, environnementales et émotionnelles, pourrait jouer un rôle clé dans la régulation du SP.

V. Le système cholinergique du tegmentum ponto-mésencéphalique

Ce système a été décrit précédemment comme un système régulateur de l'éveil. Néanmoins, des études de neuroanatomie fonctionnelle utilisant la protéine Fos comme marqueur de l'activation neuronale chez le rat ont permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de neurones marqués dans le LDT après une hypersomnie en SP ainsi qu'une corrélation positive entre les quantités de SP et le nombre de neurones exprimant à la fois Fos et l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine dans le LDT et le PPT (Maloney et coll. 1999). Ces résultats suggèrent une activation des neurones cholinergiques des noyaux tegmentaux pontiques au cours du SP. Toutefois, les neurones cholinergiques ne représentent qu'une faible proportion des neurones exprimant Fos dans ces structures après une hypersomnie en SP, une partie d'entre eux se trouvant être de nature GABAergique (Maloney et coll., 1999). Des études électrophysiologiques ont permis de distinguer plusieurs populations de neurones dans ce complexe. Des neurones SP-on ont ainsi été enregistrés dans le LDT et le PPT, en plus de ceux du SLD (El Mansari et coll., 1989; Steriade et Biesold 1990; Koyama et coll. 1998). Cependant, une étude récente combinant l'immunohistochimie du C-Fos suite à un rebond de SP à celle de la choline acétyle transférase (ChAT, enzyme de synthèse de l'ACh) a montré, chez le rat, que la majorité des neurones C-Fos de la région n'était pas de type cholinergique (Verret et coll., 2005). Ces données récentes suggèrent donc, en l'absence de vérification de la nature neurochimique des neurones SP-on enregistrés, que ces neurones ne seraient pas de nature cholinergique.

De plus, une étude récente indique également que les neurones C-Fos+ suite au rebond de SP ne sont pas de nature GABAergique (Emilie Sapin, communication personnelle). Ainsi, les neurones SP-on du complexe LDT/PPT seraient vraissemblablement de nature glutamatergique

VI. Les neurones de l'hypothalamus postérieur

Il est connu depuis 40 ans et les travaux princeps de Jouvet (1962) que les structures suffisantes à la genèse et au maintien du SP se trouvent dans le tronc cérébral. Sur la base de ces anciens travaux, le rôle de l'hypothalamus dans la régulation du SP a été largement

négligé. Cependant, chez les chats pontiques, le SP disparaît progressivement en faveur de l'éveil après 5 jours de survie. D'autre part, aucun rebond de SP n'est observé lorsque ces animaux sont soumis à une privation sélective de cet état (Jouvet 1988). Ces observations suggèrent que le tronc cérébral contient les structures responsables de l'apparition du SP, mais pas celles nécessaires à son homéostasie. En revanche, si chez les chats pontiques un isolat d'hypothalamus est laissé intact dans le crâne, alors ces animaux présentent des quantités normales de SP et peuvent survivre plusieurs mois.

Ce rôle de l'hypothalamus postérieur dans la régulation du SP a par la suite été confirmé par des études pharmacologiques et électrophysiologiques. Ainsi, l'inactivation réversible de l'aire latérale de l'hypothalamus par le muscimol, un agoniste des récepteurs GABA-A, induit une disparition du SP (Lin et coll., 1989). De plus, des neurones actifs spécifiquement pendant le SP ont été enregistrés dans cette même région (Steininger et coll., 1999; Alam et coll. 2002; Koyama et coll. 2003). Les neurones de l'hypothalamus postérieur expriment un grand nombre de neurotransmetteurs et de neuropeptides. Cependant aujourd'hui, en l'absence de démonstration expérimentale, la nature neurochimique des neurones de type SP-on de l'hypothalamus reste à déterminer.

VII. Conclusion

Comme rappelé précédemment, les réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du SP sont d'une incroyable complexité (figure 22). Cependant, et malgré d'importants progrès réalisés depuis la découverte de cet état de vigilance, de nombreux travaux sont encore nécessaires afin de comprendre dans sa globalité le réseau neuronal responsable de sa régulation.

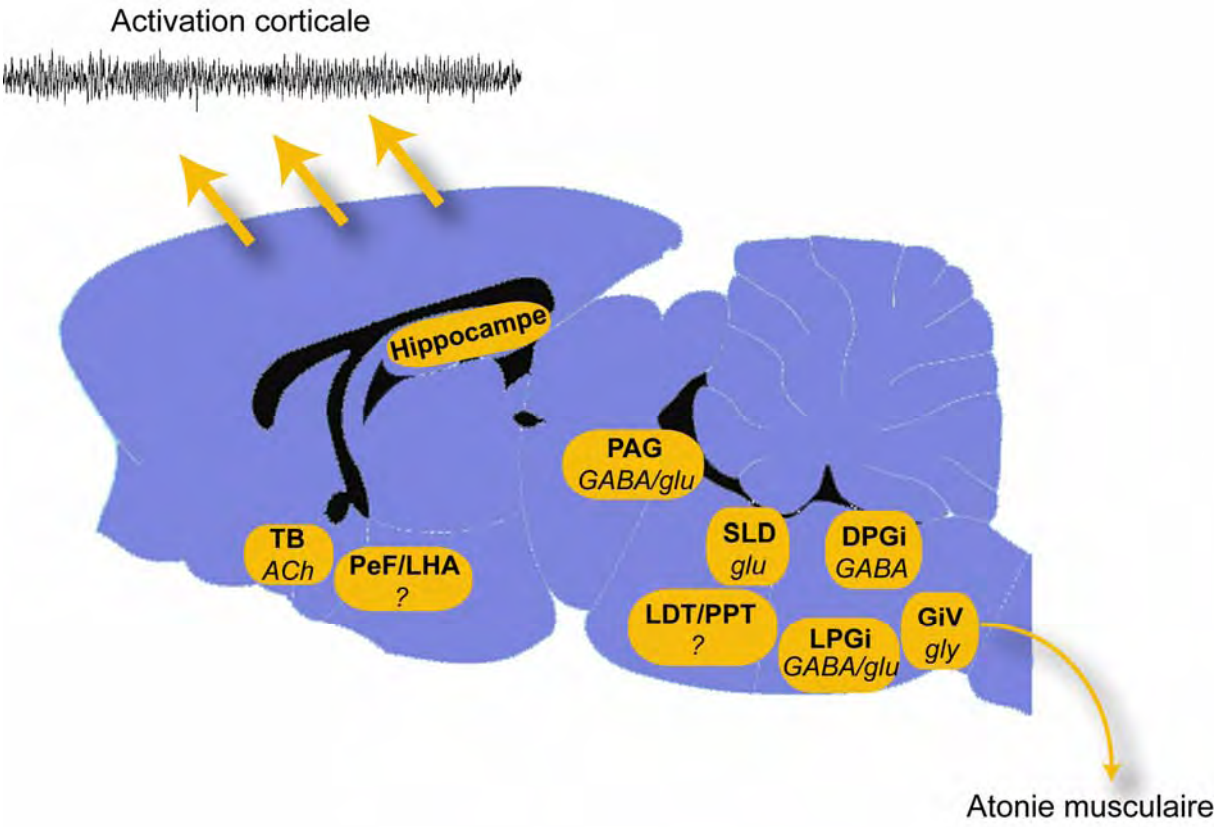


Figure 22 : Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rat indiquant les structures anatomiques impliquées dans la genèse et le maintien du SP et des oscillations thêta caractéristiques de cet état.

Modélisation des réseaux du sommeil paradoxal

L'accumulation de données anatomiques et électrophysiologiques a rapidement mené à la mise au point de modèles expliquant la survenue du SP (figure 23). Ainsi, selon McCarley et Hobson (1975) puis selon Sakai et Coll. (1981), le déclenchement du SP dépendrait d'interactions inhibitrices réciproques entre les neurones SP-on de la formation réticulé pontique et les neurones monoaminergiques :

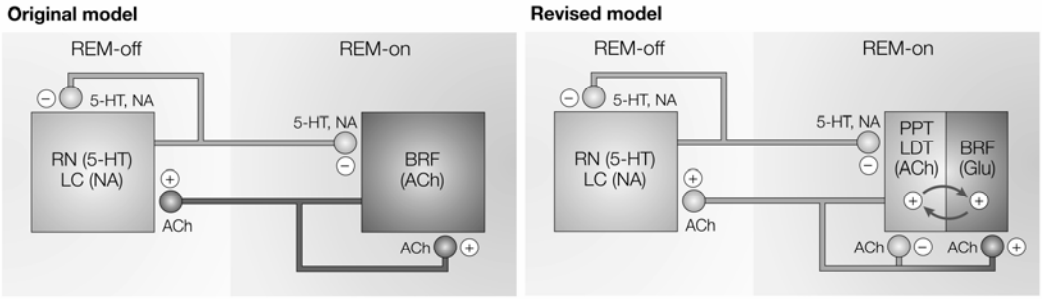


Figure 23: Modèle original (illustration de gauche) de l'interaction réciproque responsable de la régulation du SP et sa version révisée (illustration de droite). (D'après (Pace-Schott et Hobson 2002).

Le premier modèle proposé en 1975 met en jeu deux populations de neurones, une monoaminergique représentée par le LC et le NRD (« REM-off »), l'autre spécifique du SP située dans la formation réticulée ponto-mésencéphalique (brainstem reticular formation, BRF) et cholinergique (« REM-on »). Des modifications ont été apportées suite à la découverte d'autorécepteurs inhibiteurs cholinergiques dans le système ponto-mésencéphalique (PPT/LDT) et de l'existence d'une interaction excitatrice entre les neurones cholinergiques et non-cholinergiques du pont. Dans ce modèle révisé, les autorécepteurs inhibiteurs cholinergiques contribuent à l'inhibition des neurones cholinergiques du PPT/LDT en plus de l'action des voies noradrénergiques et sérotoninergiques

Cependant, la progression des connaissances neuroanatomiques a conduit à la complexification de ce modèle (figure 24):

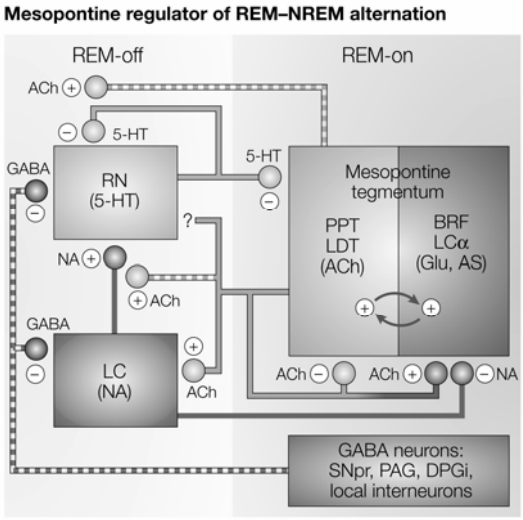


Figure 24 : Dernière version du modèle d'interaction réciproque prenant en compte les neurones GABAergique du bulbe rachidien. (D'après (Pace-Schott et Hobson 2002)

Dans ce modèle présentant des détails synaptiques additionnels, l'influence des systèmes cholinergiques et monoaminergiques reste prépondérante. Les interactions excitatrices utilisant l'acétylcholine ou les acides aminés excitateurs stimulent les neurones SP-on (« REM-on »), alors que les autorécepteurs inhibiteurs répriment cette activité. L'effet de l'acétylcholine sur les neurones monoaminergiques peut être excitateur, comme proposé dans le modèle original, mais peut aussi agir au niveau présynaptique sur la régulation de l'activité des neurones du LC et du NRD. Des populations de neurones GABAergiques contribueraient également à la modulation de ces interactions.

Cependant, de nombreuses contradictions demeurent, et en particulier le fait que le SLD ne contienne pas de neurones cholinergiques et/ou cholinoceptifs.

Ces modèles ne rendent pas compte de l'organisation du cycle veille-sommeil. En effet, une phase de SP survient toujours après une phase de SL chez le chat (Gottesmann et coll. 1984), le rat (Gervasoni et coll. 2004) et même l'homme . Ainsi, les systèmes du SL semblent fortement impliqués dans la préparation des épisodes de SP.

De plus, une étude récente a mis en évidence l'importance du SL dans l'induction des phases de SP. Chez le rat, chaque phase de SP est précédée d'une phase dite « transitoire », s'apparentant au SL et caractérisée par une forte synchronisation d'activité au sein d'un ensemble d'aires distantes (Gervasoni et coll., 2004).

Enfin, ces modèles se limitent à des interactions ponto-bulbaires. Or, il est connu que l'Hypothalamus postérieur (par exemple) participe également à la régulation des états de vigilance et plus particulièrement de l'EV.

En conclusion, le SP apparaît comme un état complexe, nécessitant la mise en jeu simultané de nombreuses structures cérébrales. Cependant, de nombreuses questions restent posées afin de « boucler la boucle » et de pouvoir décrire l'ensemble des réseaux neuronaux responsable de l'alternance des différents états de vigilance, pré requis indispensable à une meilleure compréhension des rôles du sommeil.

Stratégies expérimentales

Bien que mis en évidence il y a plus de 50 ans par Dement et Kleitman (1957) puis par Jouvet et Michel (1959), il reste encore beaucoup à faire afin de comprendre du rôle du sommeil en général, et du sommeil paradoxal en particulier.
Depuis le début des années 2000, un nombre croissant d'études porte sur le rôle du sommeil, avec une attention particulière pour le SP. Bien que ces travaux présentent un intérêt scientifique majeur, il nous semble qu'une étape clé pour la compréhension de cet état de vigilance reste en suspens :

Quelles sont les structures cérébrales et les neurotransmetteurs mis en jeux pour le déclenchement et le maintien du sommeil paradoxal?

Alors que la plupart des études sur les réseaux neuronaux responsables de la régulation du SP ont été effectuées chez le chat, il nous a paru indispensable de transposer ces connaissances au modèle animal le plus utilisé en neurosciences: le rongeur. En effet, la présence d'un rythme circadien chez ces animaux et la disponibilité de souris génétiquement modifiées en font un outil de choix pour l'étude du sommeil.
Notre travail de thèse s'inscrit donc dans la suite logique des études menées au laboratoire (Peyron 1996; Rampon 1997; Gervasoni 2000; Boissard 2002; Verret 2005) afin de décrypter les aires cérébrales impliquées dans la régulation circadienne et ultradienne du SP, et de déterminer les neurotransmetteurs impliqués dans cette régulation.

Afin de compléter l'identification des réseaux neuronaux à la base de l'alternance des différents états de vigilance, nous avons opté pour une approche délibérément pluridisciplinaire, combinant l'électrophysiologie et la pharmacologie chez le rat vigile en contention, la neuroanatomie fonctionnelle, mais également l'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés.
Plus précisément, nous avons tenté de répondre aux 3 questions suivantes :

1- QUEL EST LE ROLE DE L'ACETYLCHOLINE DANS LA REGULATION DU SP CHEZ LA SOURIS ?

Le rôle de l'acétylcholine dans la régulation du SP fait encore actuellement l'objet d'un débat acharné. Neurotransmetteur principal impliqué dans la régulation du SP chez le chat (Sakai 1988), son rôle apparait beaucoup plus limité chez le rat (Boissard et coll., 2002). En ce qui

concerne la souris, des résultats contradictoires ont été récemment reportés (Coleman et coll. 2004; Pollock et Mistlberger 2005). La disponibilité de modèles murins sélectivement invalidés pour les différents sous-types de récepteurs muscariniques apparait être un modèle de choix pour l'étude du rôle de l'acétylcholine dans la régulation du SP. Nous avons ainsi effectué des enregistrements polysomnographiques de souris invalidées pour les récepteurs M2, M3, M4 et doublements invalidées pour les récepteurs M2 et M4 **(Chapitre 1)**.

2- QUEL EST LE ROLE DE L'HYPOTHALAMUS POSTERIEUR DANS LA REGULATION DU SOMMEIL PARADOXAL ?

Suite aux études princeps de transsections chez le chat (Jouvet et coll. 1959; Jouvet 1962), le rôle de l'hypothalamus postérieur dans les mécanismes de déclenchement et de maintien du SP a longtemps été négligé, et ceci malgré les données expérimentales soulignant l'implication de cette région. En effet, outre la fonction démontrée des neurones à histamine et à hypocrétines de l'hypothalamus postérieur dans le maintien de l'éveil, l'existence de neurones actifs spécifiquement pendant le SP dans ces structures (Steininger et coll., 1999; Alam et coll., 2002; Koyama et coll., 2003) indique un rôle potentiel de certaines populations hypothalamiques dans la régulation de cet état de vigilance. Afin de confirmer l'existence de ces neurones et de les caractériser plus précisément, nous avons étudié la distribution de neurones exprimant Fos après une hypersomnie en SP dans les différentes structures de l'hypothalamus postérieur, et déterminé leur nature neurochimique en procédant à l'immunohistochimie des neuropeptides hypocrétines et « melanin concentrating hormone » ou MCH **(Chapitre 2)**.

Afin de savoir comment ces neurones étaient régulés au cours du cycle veille-sommeil, mais également pour préciser le rôle des neurones à MCH dans la régulation du SP, nous avons effectué des éjections iontophorétiques de substances excitatrices dans l'HP, couplé à la caractérisation électrophysiologique des neurones de l'HP au cours du cycle veille-sommeil **(Chapitre 3)**.

3- Le noyau reticule paragigantocellulaire dorsal (DPGi) est-il a l'origine de l'inhibition des neurones noradrenergiques (NA) du Locus coeruleus (LC) durant le SP ?

Il est admis que l'arrêt des systèmes d'EV, et particulièrement celui des neurones NA du LC est une étape indispensable au déclenchement d'un épisode de SP. Il a été montré par Gervasoni et Coll., (1998) et Verret et Coll., (2005), que cette inhibition pourrait venir de neurones GABAergiques localisés dans le DPGi. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons entrepris une caractérisation électrophysiologique du DPGi sur le modèle du rat vigile en contention. Enfin, afin de replacer le DPGi dans le circuit neuronal responsable de la régulation du SP, nous avons couplé l'éjection de traceurs neuroanatomiques (tracage rétrograde avec la CTb ou le Fluorogold et tracage antérograde avec la PHA-L) à l'immunohistochimie de la protéine Fos chez des rats privés spécifiquement de SP ou autorisés à récupérer suite à cette privation **(Chapitre 4)**.

Matériel et méthodes

Enregistrements polygraphiques

I. Rappels théoriques

La détermination des états de sommeil et d'éveil s'effectue grâce à l'enregistrement polygraphique de l'activité électrique corticale (EEG) et du tonus musculaire (EMG).
L'EEG permet de détecter les fluctuations électriques associées à la sommation de l'activité d'une large population de neurones. A la surface du crâne, les potentiels enregistrés reflètent surtout l'activité des neurones corticaux situés au voisinage des électrodes et davantage les potentiels post-synaptiques inhibiteurs et excitateurs que les potentiels d'action (Martin 1991). L'amplitude de l'EEG, son degré de synchronisation, les fréquences qui le composent sont les paramètres qui permettent de discriminer les différents états de vigilance de l'animal. L'EEG peut être référentiel (unipolaire), il consiste alors en une mesure de la différence de potentiel (ddp) entre une électrode corticale et une électrode de référence placée à distance ou différentiel (bipolaire), il mesure dans ce cas la ddp entre deux électrodes corticales.
L'EMG permet une mesure de l'activité musculaire tonique et des événements phasiques (secousses). Les électrodes musculaires sont classiquement placées au niveau des muscles posturaux de la nuque.
D'autres paramètres tels que l'électro-oculogramme (EOG, permettant de mettre en évidence les mouvements oculaires rapides dont ceux survenant durant le SP), l'activité ponto-géniculé-occipitale (PGO), la température cérébrale, les rythmes cardiaques et respiratoires peuvent compléter les mesures polygraphiques. L'EEG et l'EMG sont toutefois suffisants pour la détermination des différentes phases du cycle veille-sommeil chez le rat et la souris.

Le signal EEG recueilli par les électrodes corticales peut varier en fonction de la localisation de ces électrodes. En effet, il est admis que le signal EEG diffère fortement entre une électrode placée sur le cortex frontal (prédominance des ondes lentes, dans la gamme delta) et le cortex pariétal (prédominance des ondes thêta, du fait de la proximité de l'hippocampe chez les rongeurs). Ainsi, l'utilisation de plusieurs électrodes d'EEG permet de déterminer des variations locales de l'activité corticale. Cette technique, dite d'EEG topographique a permis l'émergence du concept de sommeil local (Krueger et coll. 1999): l'augmentation de l'amplitude des ondes lentes, index de la pression de sommeil (Borbely 1982), se propagerait

selon un axe antéro-posterieur (Vyazovskiy et coll. 2002) : il existerait donc une activité EEG particulière selon les différentes aires corticales au cours du SL.

II. Mise en œuvre

Les signaux EEG et EMG sont obtenus à partir de dérivations bipolaires. Amplifiés et filtrés (Bandes passantes EEG 0,3-75 Hz, EMG 10-200 Hz) par un enregistreur polygraphique (Reega MiniHuit, ALVAR), ces signaux sont ensuite numérisés par un convertisseur analogique-digital 16 bits (CED 1401plus, CAMBRIDGE ELECTRONIC DESIGN) à une fréquence d'échantillonnage de 500 Hz pour le rat et 250 Hz pour la souris. L'acquisition sur ordinateur (Macintosh PowerPC, APPLE et PC DELL) est effectuée à l'aide du logiciel Spike 2 (CED).

L'éveil, le SL et le SP sont déterminés suivant les critères définis par Timo-Iaria et coll. (1970) et Aston-Jones et Bloom (1981) sur des périodes de dix secondes présentant les caractéristiques décrites ci-dessous. Une analyse du spectre de fréquences de l'EEG est effectuée en contrôle.

Eveil: l'EEG est de faible amplitude et activé ou "désynchronisé". Des activités de hautes fréquences ("40 Hz") sont observées ainsi que des ondes thêta (5-9 Hz). L'EMG varie suivant l'activité motrice de l'animal. On observe une activité musculaire tonique ample avec de nombreux événements phasiques au cours de l'éveil actif et un tonus musculaire plus faible avec de rares secousses pendant l'éveil calme. Le rat est réceptif aux stimuli extérieurs.

Sommeil lent : l'EEG est de plus haut voltage (amplitude au moins double de celle de l'éveil) et présente des oscillations très lentes, les ondes delta (0.5-4 Hz), et des fuseaux (10-14 Hz). L'EEG est dit « synchronisé » et ne comporte pratiquement plus de fréquences rapides. L'activité musculaire est faible et sans aucune bouffée phasique. Le rat est immobile, il a les yeux fermés et est moins réceptif aux stimuli. En condition « libre de ses mouvements », le rat prend une posture en boule caractéristique.

Sommeil paradoxal : l'EEG, similaire à celui de l'éveil, est désynchronisé, rapide et de faible amplitude. Il présente une périodicité marquée autour de 5-9 Hz correspondant au rythme

thêta généré par les structures hippocampiques. L’activité musculaire est très faible (atonie) avec parfois de brèves bouffées phasiques ("twitches"). L'animal est toujours immobile, les yeux fermés et présente des mouvements phasiques des globes oculaires et des secousses des vibrisses.

Les souris invalidées pour différents récepteurs muscariniques

I. Les différents sous-types de récepteurs muscariniques

L'acétylcholine libérée dans la fente synaptique peut se fixer, au niveau post-synaptique sur des récepteurs de type nicotinique ou muscarinique, ces deux types de récepteurs étant très différents, tant au niveau de leurs structures que de leurs fonctions.

Les récepteurs nicotiniques, formés d'un site de fixation pour le ligand et d'un canal ionique, sont des protéines pentamériques et doivent leur nom à leur forte affinité pour la nicotine. La nicotine se fixe directement sur la sous-unité α et stimule l'ouverture de canaux cationiques non-spécifiques formés de nombreuses combinaisons de sous-unités α2, β, γ et ε.

Les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine ont été mis en évidence grace à leur forte affinité pour la muscarine, alcaloïde dérivé du champignon vénéneux *Amanita muscaria*. Contrairement aux récepteurs nicotiniques, les récepteurs muscariniques ne sont composés que d'une protéine. Ces récepteurs appartiennent ainsi à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G. Comme tous les récepteurs couplés à des protéines G, les récepteurs muscariniques sont constitués de 7 domaines hydrophobes transmembranaires reliés entre eux par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires hydrophiles.

Les récepteurs couplés aux protéines G induisent une voie de signalisation intracellulaire en se liant à une protéine G hétérodimérique constituée de 2 sous-unités, α et βγ. La sous unité α se fixe à une protéine effectrice ou à des canaux ioniques afin de stimuler ou d'inhiber la libération de second messager intracellulaire. Les sous unités βγ joueraient un rôle dans la régulation de la voie intracellulaire.

A ce jour, cinq récepteurs muscariniques ont été identifiés (de M1 à M5). Il est possible de les classés en deux groupes selon le type de protéine G activée et donc la voie de signalisation intracellulaire mise en jeux suite à leur activation :

- Les récepteurs M1, M3 et M5 seraient couplés préférentiellement à des protéines G de type G_q/G_{11} et provoquerait une dégradation de l'inositol-tri-phosphate (IP3 ; figure 25) (Hulme et coll. 2003) :

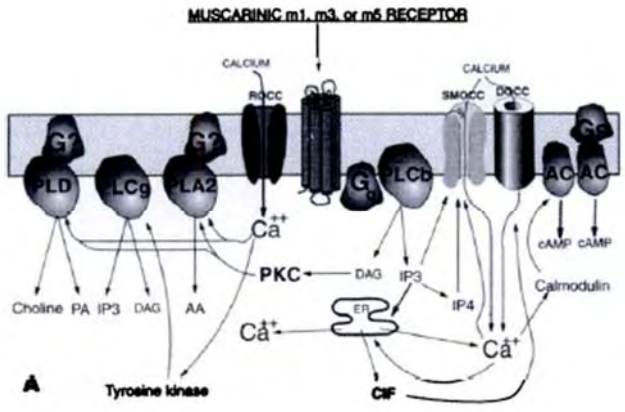


Figure 25 : Représentation de la voie intracellulaire mise en jeux suite à l'activation des récepteurs M1, M3 ou M5.
(D'après (Felder 1995).

- Les récepteurs M2 et M4 seraient couplés préférentiellement à des protéines G de type G_i ou G_0 et provoqueraient une inhibition de l'adenylate cyclase et une activation de courants potassiques rectifiant-entrants (figure 26 ; (Hulme et coll., 2003) :

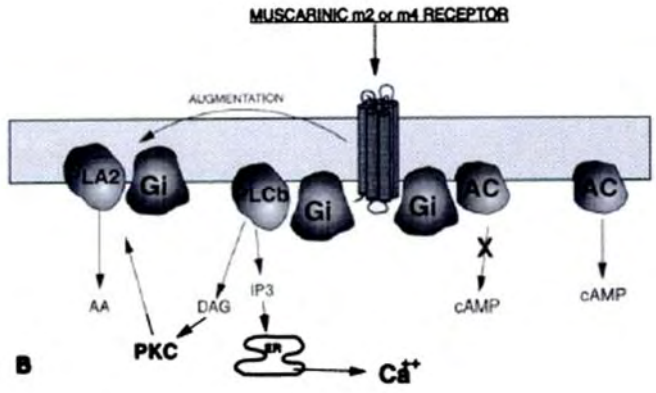


Figure 26 : Représentation de la voie intracellulaire mise en jeux suite à l'activation des récepteurs M2 ou M4.
(D'après (Felder 1995).

Bien que pouvant présenter des localisations spécifiques (les récepteurs M1 sont par exemple moins exprimés dans le télencéphale basal et les récepteurs M2 dans le cortex), la plupart des récepteurs muscariniques sont exprimés de manière ubiquitaire dans le cerveau (Caulfield 1993).

L'activation de ces récepteurs peut conduire à de nombreuses réponses neuronales. Au niveau post-synaptique, la fixation de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques induit des modifications des canaux ioniques voltage-dépendant (de types potassique ou calcique) pouvant conduire à la dépolarisation ou à l'hyperpolarisation du neurone post-synaptique.

Cependant, ces récepteurs peuvent également agir au niveau pré-synaptique en régulant la libération de neurotransmetteurs (comme l'acétylcholine elle-même, la dopamine, le glutamate ou le GABA).

Ainsi, l'acétylcholine, de par l'activation des récepteurs muscariniques, apparaît plus comme un neuro-modulateur que comme un neurotransmetteur simple.

II. Obtention de souris génétiquement modifiées

Les souris invalidées pour les différents récepteurs muscariniques (M_2, M_3, M_4 et M_2 et M_4) utilisées dans notre étude ont été développées au sein du laboratoire du Dr Jurgen Wess (NIH-NIDDK, Bethesda, Maryland, USA).

A - Pourquoi invalider un gène ?

Afin de comprendre comment et quels gènes contrôlent les mécanismes et la différenciation cellulaire, une stratégie a été développée: regarder ce qui se passe lorsqu'un gène "fonctionne mal", est absent, etc. Ces études ont d'abord été réalisées grâce à l'étude de mutants, naturels ou provoqués par l'utilisation de produits chimiques ou ionisants. C'est ainsi que, par une stratégie de mutagenèse particulièrement importante, Nüsslein-Volhardt, Lewis et Wieshaus ont démontré l'implication des gènes du complexe Hox dans le développement embryonnaire précoce de la drosophile (Nusslein-Volhard et Wieschaus 1980). Ils ont reçu conjointement, pour cette découverte, le prix Nobel de médecine en 1995.
Néanmoins, ces techniques de mutagenèse "aléatoires" posent un problème sérieux: il n'y a aucun contrôle sur les mutations qui vont avoir lieu... Ceci impose un fastidieux travail de criblage pour rechercher les mutants. De plus, les mutations obtenues correspondent souvent à une expression ou une fonction de la protéine issue d'un gène seulement altéré et non supprimé. Il est ainsi difficile de comprendre si l'effet observé est dû à l'absence de la protéine, à une expression incorrecte de la protéine, à la présence d'une protéine modifiée, etc.
Une approche à priori bien plus intéressante est donc d'éliminer purement et simplement un gène: c'est ce que l'on appelle l'invalidation d'un gène, ou plus communément le KO (Knock-Out) d'un gène. Cette technique est basée sur la recombinaison homologue. Ceci permet, d'après les conséquences observées, de proposer un rôle pour le gène en question.

B - Comment fait-on pour invalider un gène ?

Pour invalider un gène, il est nécessaire de l'avoir identifié au préalable. Le gène, sous forme d'un fragment d'ADN, doit avoir été cloné - c'est à dire qu'il doit avoir été isolé, conservé, sa séquence nucléotidique déterminée intégralement. Il est souvent aussi nécessaire de disposer

de la séquence nucléotidique des fragments d'ADN bordant ce gène dans le génome de l'organisme étudié.

L'une des techniques d'invalidation d'un gène se base sur la recombinaison homologue : On peut ainsi remplacer le gène complet, présent dans le génome de l'organisme, par une version suffisamment incomplète du gène pour qu'il ne s'exprime pas, ou par un autre gène. La première étape consiste donc en la création d'un vecteur, portant le gène invalidé.

Une fois la construction réalisée, ce vecteur est introduit dans des cellules ES (Souches Embryonnaires) par électroporation. On utilise des cellules ES car ces cellules sont capables de donner toutes les cellules de l'organisme (elles sont totipotentes). Une étape longue et fastidieuse est alors de sélectionner un clone de cellules ES ayant effectivement reçu le vecteur, et ayant procédé à la recombinaison homologue. Une des deux copies du gène est ainsi invalidée dans leur génome.

La deuxième étape consiste en l'obtention d'animaux génétiquement modifiés. Pour cela, on procède à l'injection de quelques cellules ES modifiées dans le blastocœle (cavité) de très jeunes embryons de souris. Ces cellules s'intègrent naturellement à la Masse Cellulaire Interne (MCI), ensemble de cellules dont dérivent toutes les cellules du futur organisme. Les embryons ayant reçu ces cellules ES sont alors réimplantés dans des mères porteuses. On obtient ainsi, à la naissance, des souris "mosaïques", dont les tissus dérivent pour partie des cellules de la MCI "normales", et pour partie de cellules ES modifiées.

Parmi ces individus mosaïques, il est alors nécessaire de sélectionner ceux dont les cellules de la lignée germinale dérivent de cellules ES: eux seuls seront capables de transmettre le gène invalidé à leur descendance.

A partir du moment où l'on dispose de tels individus mosaïques, la troisième étape consiste en un croisement entre ces souris et des souris "sauvages" (c'est à dire possédant le gène normal, non modifié). Ce croisement permet d'obtenir des souris hétérozygotes, possédant un allèle sauvage, et un allèle invalidé.

La dernière étape consiste alors à croiser ces souris hétérozygotes entre elles pour obtenir (dans une proportion de 25%) des souris homozygotes, possédant deux copies du gène invalidé (et donc, logiquement, aucune copie du gène fonctionnel).

C - Intérêt des homozygotes

Chez les individus homozygotes pour l'invalidation du gène, il est possible d'étudier les différentes conséquences de l'absence de ce gène sur l'organisme. Ceci peut se manifester par

des phénotypes très marqués, facilement identifiables, tels que de graves altérations du développement embryonnaire, des malformations, une stérilité, des dérèglements physiologiques. Toutefois, dans de nombreux cas, les effets peuvent être plus délicats à déceler. Ceci peut avoir de nombreuses causes: Il est possible, par exemple, que l'absence du produit du gène soit compensée par l'activation d'autres voies de régulation physiologique. Il est aussi possible que le gène soit redondant avec d'autres gènes (Caulfield et Birdsall 1998).
On le voit bien, étant donné la complexité des réseaux génétiques dans l'organisme, il n'est pas toujours simple d'interpréter les phénotypes observés.

D - Obtention des différentes souches de souris utilisées dans notre étude

- Souris invalidées pour le récepteur M_2

Les souris invalidées pour le récepteur muscarinique de type 2 (M_2) ont été obtenues par recombinaison homologue (Gomeza et coll. 1999). Un segment codant du récepteur (codant pour la région s'étendant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la troisième boucle intracellulaire) a été remplacé par un gène de résistance à la néomycine (PGK-neo).
Le vecteur formé a ensuite été injecté dans des cellules ES de souris de souche 129 par électroporation. Les cellules ES ayant intégré le vecteur furent ensuite injectées dans des blastocytes de souris de souche C57/Bl6 afin de générer des souris chimères. Après sélection des mâles chimères, ces derniers furent croisés avec des femelles de souches CF-1 afin d'obtenir des souris hétérozygotes (M_2+/-). Les souris hétérozygotes furent enfin croisées entre elles afin d'obtenir des souris homozygotes invalidées pour le récepteur muscarinique de type 2 (M_2-/-).
Afin de vérifier l'inactivation sélective du récepteur muscarinique de type 2 sur les souris M_2-/-, Gomeza et coll., ont réalisé des hybridations in-situ des récepteurs M_2 chez les souris M_2+/+, M_2+/- et M_2-/-. Ils n'ont ainsi observé aucun signal de fixation chez les souris M_2-/- (figure 27).

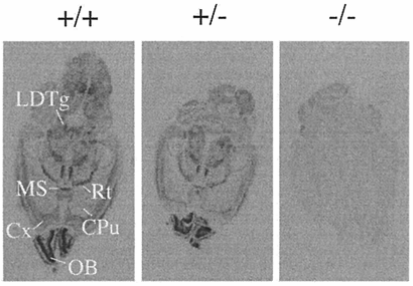


Figure 27 : hybridation in-situ de l'ARNm des récepteurs M_2 chez les 3 types de souris M_2+/+, M_2+/- et M_2-/-. Notez l'absence de signal chez les souris homozygotes M2-/-, (D'après (Gomeza et coll., 1999).

A l'inverse, l'expression des récepteurs muscariniques de type 4, fonctionnellement proches des récepteurs M_2, n'est pas modifiée chez les souris M_2-/-.

- **Souris invalidées pour le récepteur M_4**

Les souris invalidées pour le récepteur muscarinique de type 4 (M4) ont été obtenues selon la même procédure que celle décrite pour les souris M_2-/- (Gomeza et coll. 1999). Ici, le segment codant remplacé par un gène de résistance à la néomycine s'étendait du milieu du second domaine transmembranaire à l'extrémité N-terminale de la troisième boucle intracellulaire.

Afin de vérifier l'inactivation sélective du récepteur muscarinique de type 4 sur les souris M_4-/-, Gomeza et coll., ont réalisé des hybridations in-situ des récepteurs M_4 chez les souris M_4+/+, M_4+/- et M_4-/-. Ils n'ont ainsi observé aucun signal de fixation chez les souris M_4-/- (figure 28).

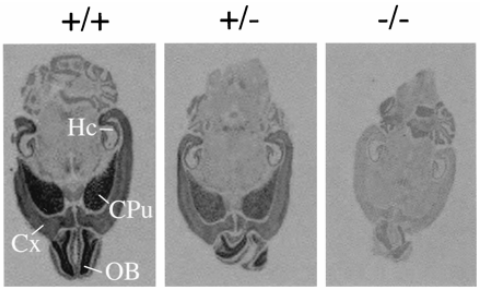


Figure 28 : hybridation in-situ de l'ARNm des récepteurs M4 chez les 3 types de souris M_4+/+, M_4+/- et M_4-/-. Notez l'absence de signal chez les souris homozygotes M4-/-, (D'après (Gomeza et coll., 1999).

A l'inverse, l'expression des récepteurs muscariniques de type 2, fonctionnellement proche des récepteurs M_4, n'est pas modifiée chez les souris M_4-/-.

- **Souris invalidées pour les récepteurs M_2 et M_4**

Afin d'obtenir des souris doublement invalidées pour les récepteurs muscariniques de type 2 et 4, Duttaroy et coll., ont croisé les souris M_2-/- avec les souris M_4-/-. Les souris hétérozygotes obtenues furent ensuite croisées entres elles afin d'obtenir les souris M_2M_4 -/- (6% des souris issues de ce croisement étant effectivement doublement invalidées pour les 2 types de récepteurs).

Afin de vérifier que l'inactivation des récepteurs M_2 et M_4 ne s'accompagnait pas d'une hyper-expression des récepteurs M_1 et M_3, Duttaroy et Coll., ont évalué l'expression de ces récepteurs dans différentes régions cérébrales. Comme indiqué dans la figure 29, il n'y a pas

de différence d'expression des récepteurs M_1 et M_3 entre les souris sauvages et les souris M_2M_4 -/-, indiquant une absence de compensation au cours du développement.

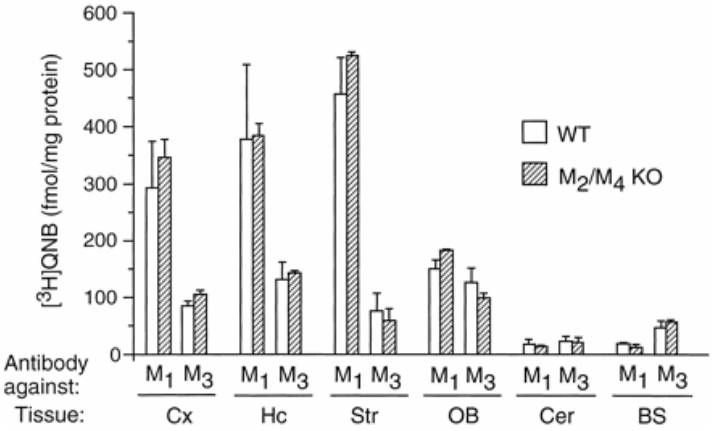


Figure 29 : Taux d'expression des récepteurs M_1 et M_3 dans différentes aires cérébrales (Cx : cortex ; Hc : hippocampe ; Str : stiatum, OB : bulbe olfactif ; Cer : cervelet et BS : région ponto-bulbaire). (D'après (Duttaroy et coll. 2002).

- **Souris invalidées pour le récepteur M_3**

Les souris invalidées pour le récepteur muscarinique de type 3 (M_3) ont été obtenues selon la même procédure que décrite pour les souris M_2-/- et M_4-/- (Yamada et coll. 2001). Dans cette étude, le segment codant remplacé par un gène de résistance à la néomycine comprenait le site d'initiation de la transcription du récepteur M_3 (figure 30).

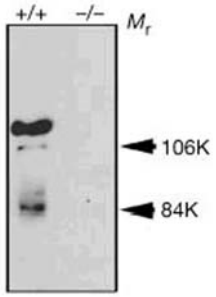


Figure 30 : Western blot sur du cortex cérébral de souris M_3+/+ et M_3-/-, utilisant un anti-corps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale du récepteur M_3. Notez l'absence de signal chez les souris M_3-/-. (D'après (Yamada et coll., 2001).

III. Apport des souris KO pour l'étude du cycle veille-sommeil

Bien qu'ayant remarquablement progressé depuis plus de 50 ans, la recherche sur le sommeil s'est vu confronter à un problème majeur : la sélectivité relative des agonistes et antagonistes des différents sous-types de récepteurs impliqués dans la régulation des états de vigilance. L'arrivé des souris KO s'est donc présentée comme un outil de choix pour une étude fine de la régulation du cycle veille-sommeil.

L'un des exemples les plus marquants concerne le rôle de l'adénosine comme substance hypnogène. Il est ainsi connu depuis de nombreuses années que la caféine, stimulant de l'éveil, agit en bloquant l'action de l'adénosine (voir (Fredholm et coll. 1999) pour revue). De plus, l'injection d'agonistes de l'adénosine chez le rat induit une augmentation des quantités de sommeil (Radulovacki et coll. 1982; Radulovacki et coll. 1984). Ainsi, l'adénosine serait une substance hypnogène accumulée durant l'EV et constituerait un signal pour la régulation homéostatique du sommeil (Benington et Heller 1995). Quel est alors le sous type de récepteur impliqué dans l'action hypnotique de l'adénosine, les récepteurs A1 ou A2a ? De nombreuses études ont ainsi tenté de répondre à cette question (Satoh et coll. 1996; Satoh et coll. 1998; Basheer et coll. 1999; Urade et Hayaishi 1999; Strecker et coll. 2000; Basheer et coll. 2001; Basheer et coll. 2001; Scammell et coll. 2001), apportant des résultats contradictoires. La disponibilité de souris spécifiquement invalidées pour les récepteurs A1 ou A2a a permis de répondre en partie à cette question. L'effet de l'adénosine sur le sommeil serait préférentiellement médié par les récepteurs A2a (Stenberg et coll. 2003; Urade et coll. 2003).

L'utilisation des souris KO a de plus permis la confirmation de certaines hypothèses. C'est le cas en particulier des souris invalidées pour l'enzyme de synthèse de l'histamine, qui montrent une diminution des quantités d'EV et une augmentation des quantités de sommeil (Parmentier et coll., 2002), mais également des souris KO pour l'hypocrétine, qui montrent un comportement proche de celui observé dans la narcolepsie humaine (Chemelli et coll., 1999).

Cette approche expérimentale permet également de préciser le rôle de différents sous-types d'un récepteur. Si, de manière générale, le rôle de la 5-HT dans la régulation du SP est connu, l'utilisation d'antagonistes des différents récepteurs 5-HT ne permettaient pas d'individualiser le rôle de chaque récepteur. Ainsi, les études du groupe de Joëlle Adrien ont permis, grâce à l'utilisation de différents modèles murins (souris 5-HT_{1A}-/-, 5-HT_{1B}-/-, 5-HT_{2A}-/-, 5-HT_{2C}-/-, 5-HTT-/-…) de mieux cerner le rôle de la 5-HT dans la régulation du SP (en particulier de son rôle repressif vis-à-vis du SP), du rebond de SP suite à sa privation instrumentale ou suite à un stress aigu (Pour revue, voir (Adrien et coll. 2004)).

Cependant, l'étude de souris KO peut également conduire à l'obtention de résultats contradictoires avec ceux obtenus par des techniques plus « classiques ». Plus spécifiquement, il était communément admis que l'effet éveillant du Modafinil, un stimulant de l'EV utilisé entre autre comme traitement de la narcolepsie, était dû à une augmentation de la transmission noradrénergique, et ce par de multiples approches expérimentales (Duteil et coll. 1990; Akaoka et coll. 1991; Lin et coll. 1992; De Sereville et coll. 1994; Touret et coll. 1994;

Ferraro et coll. 1997; Deroche-Gamonet et coll. 2002; Gallopin et coll. 2004). Or, une étude menée sur des souris KO pour le transporteur de la dopamine (KO DAT) a montré que le Modafinil n'avait plus d'effet sur ces souris (Wisor et coll. 2001) : l'effet du modafinil passerait donc par le système dopaminergique. Il semble actuellement difficile, voir impossible, de concilier ces résultats.

Ces données montrent l'intérêt de l'utilisation de souris génétiquement modifiées pour l'étude du cycle veille-sommeil. Cependant, il est indispensable de considérer ces animaux comme un outil complémentaire plutôt que comme une fin en soi, et donc de procéder à une interprétation mesurée des résultats obtenus.

IV. Mise en œuvre

A - Implantation des animaux

Des souris mâles (n=40 : $4M_2$/+, $4M_2$-/- ; $6M_3$+/+, $6M_3$-/- ; $4M_4$+/+, $4M_4$-/- ; $6M_2M_4$+/+, $6M_2M_4$-/-) âgées de 10 à 14 semaines ont été utilisées dans notre étude. Anesthésiées au pentobarbital sodique (I.P., 20mg/kg), elles sont maintenues dans un appareil stéréotaxique (D.KOPF Instruments) à l'aide de barres d'oreilles et d'une pièce de gueule. Après incision longitudinale médiane, la peau du crâne est réclinée, et les os, soigneusement dégagés, sont raclés puis dégraissés à l'alcool.

Trois vis d'acier inoxydable sont implantées dans les os frontaux et pariétaux et trois fils d'acier terminés par des sphères d'étain sont insérés dans les muscles de la nuque pour les enregistrements respectifs de l'EEG et de l'EMG.

Comme les caractéristiques de l'EEG dépendent de la localisation des électrodes corticales, leurs positions ont été standardisées. Ainsi, ces électrodes sont placées sur le cortex frontal droit (1 mm latéral et rostral au bregma), et bilatéralement sur les cortex pariétaux (1 mm latéral par rapport à la suture centrale et à égale distance entre le bregma et le lambda).

Un dépôt de résine dentaire (Super-Bond C&B, SUN MEDICAL CO. LTD) est ensuite réalisé sur la surface du crâne et les six électrodes sont reliées à un connecteur placé sur la tête de l'animal. Une prothèse de ciment dentaire (De Trey, DENTSPLY) est alors montée afin de fixer le micro-connecteur des fils EEG et EMG. Une application de sulfamides en poudre

(Exoseptoplix, DOMS ADRIAN) est effectuée sur le pourtour de la prothèse pour prévenir toute infection de la plaie.
Au terme de l'implantation, la souris porte une prothèse d'environ 3 grammes qui permet l'enregistrement polygraphique.
Après une période de récupération post-chirurgicale de 48 heures, les souris sont placées dans une chambre d'enregistrement insonorisée, où la lumière (cycles de 12h, avec allumage à 5h) et la température (23 ± 1°C) sont contrôlées. Elles sont ensuite connectées au câble d'enregistrement durant 5 jours, afin de les habituer aux conditions expérimentales.

B – Enregistrements polysomnographiques et analyse du sommeil

Suite à cette habituation, toutes les souris ont été enregistrées durant 72h. Cependant, seules les 24h intermédiaires ont été analysées *offline* par période de 10 secondes selon les critères décrits précédemment (Cf. Partie 1). Les hypnogrammes ont été construits automatiquement grâce à une routine Spike2 développée au laboratoire. Les valeurs ont finalement été importées dans un tableur (Excel, Microsoft) afin de calculer les paramètres standards décrivant chaque état de vigilance (quantités, pourcentages, durées moyennes…) sur 24h et par période de 12h (phase claire et phase sombre).

C – Analyse spectrale de l'EEG

Afin de déterminer les caractéristiques spectrales de l'EEG durant l'EV et le SP, nous avons reproduit un protocole permettant une analyse fine du signal (Parmentier et coll., 2002; Beuckmann et coll. 2003). Cette étude du signal EEG a été effectuée en collaboration avec Jean-Christophe Comte, Physicien et post-doctorant au laboratoire.
Une transformée rapide de fourier (FFT, méthode mathématique fondée sur la démonstration émise par le mathématicien français Joseph Fourier, selon laquelle un son complexe peut se « réduire » à une somme de composantes sinusoïdales. Cette technique permet ainsi de décomposer une fonction du temps en un spectre de fréquences, à la manière d'un prisme qui décompose la lumière en un spectre de couleurs), nous permettant d'obtenir le spectre de fréquence (de 0,8 a 47,6 Hz, avec une résolution de 0,24Hz), a été effectuée pour chaque souris sur 40 épisodes (sans artefacts) de 5 secondes d'EV et de SP au cours de la phase claire et de la phase sombre.

Ces 40 épisodes ont été sélectionnés, pour toutes les souris, dans les 3 heures suivant l'allumage ou l'extinction des lumières (de 5 à 8h pour la phase claire et de 17 à 20h pour la phase sombre).

Afin de déterminer le pic de fréquence du thêta (TPF pour theta pic frequency), nous avons considéré la bande spectrale comprise entre 4 et 9 Hz comme une distribution statistique suivant une loi gaussienne. Puis, pour chacun des 40 épisodes, la distribution gaussienne la plus proche a été calculée en utilisant la méthode dite « des carrés moyens », la moyenne de la distribution gaussienne correspondant à la valeur du TPF.

Afin de déterminer si les TPF présentaient une différence entre les souris KO et leurs contrôles respectifs, nous avons calculé la surface de recouvrement des 2 distributions moyennes. Ainsi, nous avons considéré les 2 TPF comme des raies spectrales différentes quand la surface de recouvrement des 2 distributions était inférieure à 30% (comme classiquement utilisé en optique (Bruat 1965)).

Enfin, nous avons également calculé la puissance totale de la bande thêta (CPT pour cumulative theta power) en calculant la somme des amplitudes pour chaque bande de fréquence comprise entre 4 et 9Hz.

Afin d'obtenir des données comparables, l'amplitude de chaque bande de fréquence était divisée par l'amplitude totale du spectre pour chaque animal (puissance spectrale relative).

Le modèle du rat vigile en contention

I. Le système de contention

A –Présentation du système de contention

Le système de contention utilisé dans notre étude a été développé au sein du laboratoire par Laurent Darracq, en collaboration avec l'équipe du Dr Guy Chouvet et une entreprise de micro-mécanique (GFG, Pierre-Bénite).

Il s'inspire du dispositif développé par Marie-Hélène Bassant (1990) et a été modifié afin d'augmenter la stabilité des enregistrements électrophysiologiques.

Plus spécifiquement, le système se compose de deux parties (figure 31):

- Une pièce en « U », fixée sur la tête de l'animal lors de l'implantation qui nous permet ensuite de fixer l'animal dans l'appareil de contention.
- Un chariot mobile (figure 31), monté sur glissières, qui s'insère dans un appareil stéréotaxique classique (D.Kopf).

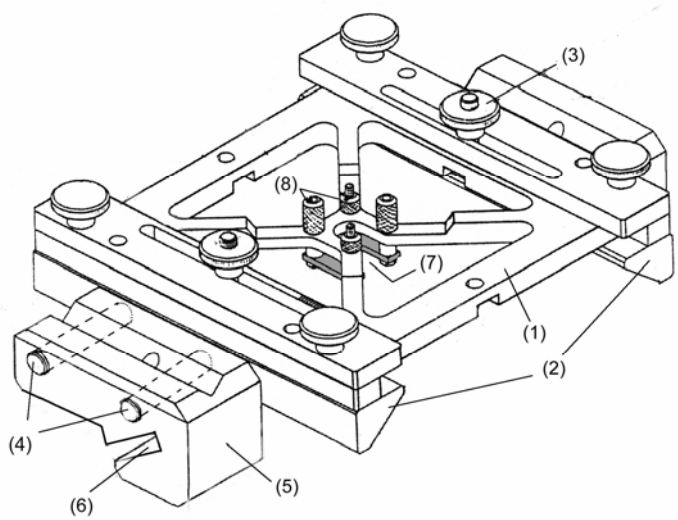


Figure 31. Schéma de notre dispositif de contention. Le chariot mobile (1) peut coulisser d'avant en arrière sur deux glissières horizontales (2). Des vis de blocage (3) le maintiennent dans une position donnée. Chaque des glissières comporte deux tiges (4) engagées dans un support (5) fixé à l'appareil stéréotaxique. Lors de l'implantation, les barres d'oreilles sont insérées dans ce support (6). La pièce en "U" (7) fixée sur le crâne du rat est maintenue par quatre vis (8).

La pièce en U s'insère dans la partie centrale du cadre de contention où elle est fixée à l'aide de quatre écrous. L'ensemble assure une contention stéréotaxique stable dans un cadre

présentant un très faible jeu mécanique et ne requiert pas l'utilisation de barres d'oreilles. Le chariot est mobile selon l'axe antéro-postérieur grâce au système de glissières et peut être orienté dans n'importe quel sens afin de positionner l'ouverture du "U" dans l'axe rostro-caudal ou médio- latéral, permettant ainsi de multiples configurations d'implantation de cette platine et l'accès à presque toutes les structures cérébrales chez le rat.

Ce dispositif a fait l'objet de plusieurs articles (Darracq et coll., 1996; Gervasoni et coll., 1998; Gervasoni et coll., 2000; Boissard et coll., 2002). Ces études montrent son efficacité pour l'enregistrement des neurones durant le cycle veille-sommeil et leur étude pharmacologique.

B –Pertinence du modèle pour l'étude du cycle veille-sommeil

L'étude électrophysiologique des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil doit s'effectuer chez un animal non-anesthésié présentant une alternance normale des états de vigilance.
Or, la majorité des études portant par exemple sur les interactions thalamo-corticales mises en jeux durant le SL ont été, et sont toujours, effectuées sur l'animal anesthésié à la kétamine-xylazine, anesthésique interagissant avec les systèmes cholinergiques, opiacés et monoaminergique et provoquant un état dissociatif : le système thalamo-cortical est ainsi déprimé pendant que le système limbique est activé. (Steriade et coll. 1991; Steriade 2000). Bien que ces animaux présentent un EEG caractérisé par des oscillations lentes (dans la gamme delta ; 0,5-4,5 Hz) très proches des oscillations observées lors du SL chez l'animal vigile, il nous semble délicat de considérer que l'état induit par les anesthésiques est en tout point semblable à du SL naturel.
Le développement des techniques électrophysiologiques a permis, ces vingt dernières années, de déterminer l'activité électrophysiologique de neurones chez l'animal vigile. Cependant, ces études utilisent le plus souvent des électrodes en tungstène, implantées à demeure présentant des désavantages certains : une sélectivité limitée lors des enregistrements électrophysiologiques (la fréquence de décharge d'un neurone donné ne peut ainsi être apprécié qu'après traitement du signal obtenu et sélection des PA sur la base de leur forme) et surtout une liberté de mouvement limitée (en particulier dans les axes antero-posterieur et medio- latéral).

L’utilisation du modèle du rat vigile en contention permet de s’affranchir des anesthésiques généraux, d’enregistrer l’activité de neurones avec une très bonne sélectivité grâce aux pipettes de verres et autorise des déplacements très importants (il est possible de déplacer la pipette d’enregistrement de plusieurs millimètres selon les axes antéro-postérieur et médio-latéral).

De plus, ce modèle permet la réalisation d’études pharmacologiques fines de par l’utilisation de l’iontophorèse. A notre connaissance, l’iontophorèse est la méthode la plus fine pour apprécier l’effet d’une substance pharmacologique sur la décharge unitaire d’un neurone, ou encore pour effectuer des stimulations pharmacologiques de faible diamètre. Il a en effet été montré, par exemple, un rapport de diffusion de plus de 2 entre la microdialyse et l’iontophorèse (750 vs 350µm de diffusion pour l’éjection d’un antagoniste GABAergique (Goutagny et coll. 2005)). Enfin, il est également possible de combiner ces études électrophysiologique et pharmacologique avec des études de neuroanatomie fonctionnelle.

La contention ne modifie-t-elle pas le sommeil ? Cette question est légitime. Il a en effet été montré que la répétition d’un stress modéré diminue drastiquement le SL et provoque un fractionnement du SP (Cheeta et coll. 1997). Or, après habituation, il n’a pas été reporté de modifications de l’architecture du cycle veille-sommeil chez le rat en contention (Gervasoni 2000). De plus, lors de stress chronique, il a été reporté une augmentation du poids des glandes surrénales (Bassett et Cairncross 1975). Dans nos conditions expérimentales et après trois semaines d'expérimentation, les glandes surrénales ne présentent pas d'hypertrophie (Souliere et coll. 2000). Enfin, le sommeil ne semble pas être altéré du point de vu qualitatif. En effet, l'analyse spectrale révèle que le spectre de fréquence de l'EEG d'une part et les puissances de l'EEG dans les différentes bandes de fréquence d’autre part varient suivant le stade et ne sont pas significativement modifiés dans nos conditions expérimentales comparativement à un rat libre de se mouvoir (Gervasoni 2000).

Ainsi, nous pouvons considérer que dans nos conditions expérimentales, le sommeil des rats en contention n’est pas modifié, tant sur le plan quantitatif que qualitatif.

Ainsi, le rat vigile en contention, de par la possibilité de combiner électrophysiologie, pharmacologie locale et neuroanatomie fonctionnelle, est un modèle adéquat pour l’étude des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil.

II. Préparation des animaux pour la contention

A –Implantation des animaux

- **Protocole général d'implantation**

Des rats mâles Sprague Dawley (OFA, IFFA CREDO) pesant de 260 à 280 grammes ont été utilisés dans notre étude. Anesthésiés à l'hydrate de chloral (I.P., 400 mg/kg), ils sont maintenus dans un appareil stéréotaxique (D.KOPF Instruments) à l'aide de barres d'oreilles et d'une pièce de gueule. La température corporelle est maintenue à 37-38°C à l'aide d'une couverture chauffante et d'une sonde thermique rectale. Après incision de la peau, les os sont soigneusement dégagés, raclés à l'aide d'une rugine puis dégraissés à l'alcool.

Les électrodes pour la polysomnographie sont implantées puis reliées à des connecteurs placés sous la pièce en U. Un dépôt de résine dentaire (Super-Bond C&B, SUN MEDICAL CO. LTD) est ensuite réalisé sur la surface du crâne à l'exception de la suture lambdoïde ou bregmoïde et d'une zone de cinq millimètres de diamètre délimitée sur l'os occipital ou pariétal au-dessus des structures d'intérêt.

Le chariot mobile est ensuite fixé à l'appareil stéréotaxique de sorte que, la pièce en "U" qu'il maintient soit placée au-dessus du crâne. Un puits de ciment dentaire (De Trey, DENTSPLY) est alors monté afin de fixer la pièce de contention et le micro-connecteur. Après séchage complet, les quatre vis retenant la pièce en "U" ainsi que le chariot sont retirés. Enfin, le puits d'accès est comblé par un pansement (Spongel, HOUDE) imbibé de solution antibiotique (Soframycine, HOECHST) et recouvert de cire de Horsley (BRAUN SURGICAL). Une application de sulfamides en poudre (Exoseptoplix, DOMS ADRIAN) est effectuée sur le pourtour de la prothèse pour prévenir toute infection de la plaie.

Au terme de l'implantation, le rat porte une prothèse d'environ 5 grammes qui permet de le maintenir sans douleur dans l'appareil stéréotaxique avec une position de la tête strictement identique à celle de l'implantation. (figure 32)

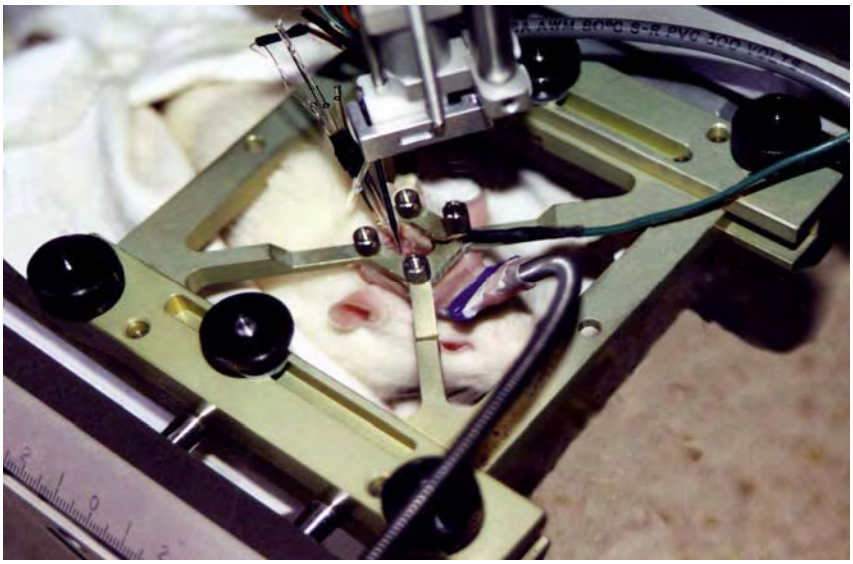


Figure 32. Photographie d'un rat vigile en contention stéréotaxique.

- **Implantation pour l'enregistrement de l'hypothalamus postérieur**

Les électrodes d'EEG, constituées de 4 vis d'acier inoxydables, sont implantées dans les os frontaux, pariétaux et occipitaux. L'EMG est enregistré grâce à deux fils d'acier terminés par des sphères d'étain insérés dans les muscles de la nuque. Ces six électrodes sont reliées à un connecteur placé en arrière de la tête de l'animal. Afin d'obtenir un puits centré sur les coordonnées de l'hypothalamus postérieur, l'ouverture du U est placée latéralement.

- **Implantation pour l'enregistrement du DPGi**

Cinq vis d'acier inoxydables sont implantées dans les os frontaux, pariétaux et occipitaux, deux fils d'acier terminés par des sphères d'étain sont insérés dans les muscles de la nuque et deux électrodes de cuivre isolées et vernies terminées par des sphères d'étain aurifiées sont placées dans chaque œil en arrière du globe oculaire pour les enregistrements respectifs de l'EEG, de l'EMG et de l'EOG. Ces onze électrodes sont reliées à deux connecteurs placés en avant de la tête de l'animal. Afin d'obtenir un puits centré sur les coordonnées du DPGi, l'ouverture du U est placée vers l'arrière.

B - Habituation à la contention

Après une période de récupération post-chirurgicale de 48 heures, on procède pendant 8 à 10 jours à l'habituation des rats à la contention suivant un protocole de conditionnement avec renforcement positif.

Enveloppés dans une chaussette lâche et installés sur un hamac, les rats apprennent à rester tête fixée dans l'appareil stéréotaxique. Plusieurs courtes sessions de cinq à dix minutes sont effectuées le premier jour, puis la durée de contention est progressivement allongée. Ils sont retirés de l'appareil dès qu'ils présentent des signes persistants d'inconforts (agitation excessive, cris, mictions, défécations ou entrechoquement des incisives). Au terme de chaque séjour dans l'appareil, les rats sont récompensés par un petit morceau de gâteau.
Nous avons considéré que les rats étaient habitués dès lors qu'ils pouvaient supporter calmement une contention de cinq heures en présentant une alternance normale des états de vigilance.
La veille du premier enregistrement, on procède à la résection de la dure-mère sous anesthésie générale. Une trépanation de 4 mm de diamètre est effectuée et la dure-mère exposée est alors délicatement découpée sur le pourtour de l'ouverture à l'aide d'une aiguille. Un nouveau pansement est appliqué et le puits est refermé comme précédemment.

En dehors des sessions d'habituation ou d'enregistrement, les rats sont placés dans une cage individuelle (baril) avec nourriture et eau *ad libitum*.

III - Déroulement des sessions d'enregistrement

Un même animal est utilisé pour des sessions d'enregistrement quotidiennes pendant une à deux semaines. D'une durée théorique de cinq heures, une session expérimentale était soit abrégée lorsque l'animal présentait une agitation excessive, entraînant la perte répétée du signal extracellulaire, soit prolongée lorsque l'ensemble des conditions expérimentales était particulièrement favorable (rat calme, enregistrement extracellulaire peu dégradé).

Le rat est placé en contention dans le hamac. Le pansement couvrant la trépanation retiré, quelques gouttes d'anesthésique local (Xylocaïne, ASTRA) sont déposées sur le cerveau avant de dégager les éventuels replis de dure-mère. La pipette est placée sur le cerveau aux coordonnées antéro-postérieures et médio-latérales du DPGi ou du PH. L'ensemble pipette multicanaux-électrode d'enregistrement est descendu progressivement jusqu'à la profondeur de la structure cible.

Dès que le signal d'un neurone est détecté, l'acquisition sur ordinateur est déclenchée et l'on procède à un enregistrement de l'activité unitaire spontanée au cours d'un cycle veille-sommeil complet (EV-SL et SP). Après l'expérience, qui se termine le plus souvent par la perte de l'enregistrement unitaire, l'acquisition est arrêtée puis lancée à nouveau pour le neurone suivant.

Au cours de ces différentes sessions expérimentales, des éjections de traceurs rétrogrades et antérogrades sont effectuées afin d'une part de localiser les sites d'enregistrement, et d'autre part de mettre en évidence les efférences et les afférences de la région étudiée.

Dans le cadre des expériences de pharmacologie locale, les paramètres d'éjections sont fixes (100nA durant 15 min). Ces éjections sont effectuées après une période d'enregistrement contrôle de 60 min. L'acquisition est arrêtée après une période de récupération d'une heure.

Le dernier jour d'enregistrement, une éjection (de substance pharmacologique ou de NaCl) longue (90min, 100nA) est effectuée afin de pouvoir pratiquer l'immunohistochimie de la protéine c-Fos, et donc de déterminer les neurones activés suite à l'éjection pharmacologique (figure 33).

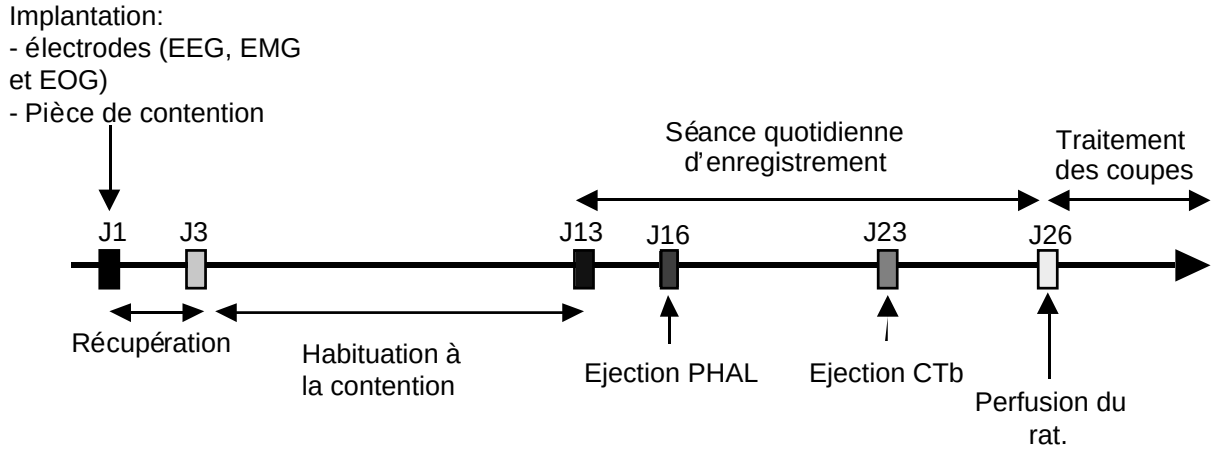


Figure 33 : décours expérimental

Enregistrements extracellulaires unitaires

I. Considérations techniques

L'enregistrement extracellulaire mesure les variations de potentiel au voisinage d'une cellule à travers la résistance constituée par le milieu extracellulaire. Les potentiels enregistrés bien que de faible amplitude (de l'ordre du microvolt) reflètent fidèlement les fluctuations électriques de la membrane cellulaire. Suivant les options de filtrage utilisées, le potentiel extracellulaire peut être ainsi considéré comme la dérivée seconde du potentiel transmembranaire (Geddes 1972; Grace et Bunney 1983; Grace et Bunney 1983).
La mesure de l'activité extracellulaire peut être réalisée avec une sensibilité décroissante à l'aide de fibres de carbones, d'électrodes métalliques, ou de pipettes de verre. Ces dernières présentent toutefois une meilleure sélectivité et sont par conséquent plus adaptées à l'enregistrement unitaire (Geddes 1972).

II. Mise en œuvre

Les potentiels d'action extracellulaires (PA) sont enregistrés à l'aide de micro-électrodes de verre avec filament (GC-150F-10, KWICK) étirées (étireuse PE 10, NARISHIGE et étireuse horizontale P97 Sutter instruments), cassées à la pointe à un diamètre externe de 2µm et remplies d'une solution d'acétate de sodium 0,5 M contenant 2% (poids/volume) de Bleu de Pontamine (PSB). L'impédance mesurée en courant continu et à 10 Hz est de 5 à 10 mégohms. La référence électrique (potentiel zéro) est constituée d'un fil d'argent chloruré placé dans le puits rempli d'une solution de chlorure de sodium à 0,9%.

L'électrode d'enregistrement est descendue dans le cerveau par paliers successifs à l'aide d'un micro-descendeur piézo-électrique (BURLEIGH.). Le signal recueilli est pré-amplifié (P16, GRASS), filtré (signal AC; bande passante 0,3-10kHz) ou non filtré (signal DC; bande passante 0-10kHz). Le signal AC est également amplifié et filtré par un audiomoniteur (GRASS). Les PA extracellulaires sont visualisés sur deux oscilloscopes (modèles HM 203-7, HAMEG et 2211 TEKTRONIX) suivant les deux modalités AC et DC et détectés par un sélecteur d'amplitude (Spike trigger NL201, NEUROLOG). Le signal de ce dernier ainsi que

le signal AC échantillonné à 15KHz sont enregistrés en ligne simultanément aux signaux polygraphiques.

Pharmacologie locale par micro-iontophorèse

I. Considérations techniques

La technique de micro-iontophorèse consiste à faire passer un courant électrique constant de l'ordre de quelques dizaines de nano-ampères à travers les canaux d'une micro-pipette de verre contenant des substances ionisées (Bloom 1974; Stone 1985). La quantité de charges alors éjectée de la micro-pipette obéit à la loi de Faraday :

$$Q=n*(I*t)/(Z*F)$$

Q correspond à la quantité de charges en coulomb, n au nombre de transport de la molécule, I à l'intensité du courant appliqué, t à la durée d'éjection, **Z** à la valence de la molécule ionisée et **F** à la constante de Faraday, soit 96500.

n est un facteur complexe dépendant à la fois de la solubilité, de la polarité, du degré de dissociation de la molécule et du milieu dans lequel elle se trouve. Cette valeur conditionne la mobilité électrophorétique de la molécule, mais elle n'est pas toujours déterminée pour une molécule donnée. Il en résulte que la quantité de molécules éjectée ne peut être connue exactement. Selon la loi énoncée précédemment, elle est néanmoins proportionnelle à l'intensité et à la durée d'éjection :

$$Q=n'*I*t$$

Les molécules chargées positivement, ou cations, sont éjectées au moyen d'un courant positif et retenues grâce à un courant négatif. L'inverse s'applique aux molécules chargées négativement, ou anions.

Si en théorie le début de l'éjection est instantané, en pratique elle se produit avec une certaine latence qui dépend notamment de l'intensité et de la durée du courant de rétention.

Le seul passage d'un courant d'éjection vers la référence électrique peut affecter l'excitabilité de la membrane du neurone enregistré. Pour limiter cet effet courant, il est nécessaire d'utiliser un canal de balance, rempli de NaCl à 0.9 %, auquel est appliqué un courant de sens contraire et d'intensité égale à la somme algébrique des courants éjectés dans les autres tubes (Stone 1985).

II. Mise en œuvre

A - Fabrication des pipettes

Un assemblage de six tubes capillaires avec filament interne (GC-150F-10, KWICK) maintenus autour d'un tube central (GC-150F-15, KWICK) par des anneaux thermocollants est d'abord vrillé de 120 degrés puis pré-étiré d'environ 2 à 3 mm (Figure 34). La pipette multicanaux est ensuite étirée, cassée à la pointe à un diamètre externe de 12 à 15 µm sous contrôle microscopique et coudée à 10 mm de son extrémité.

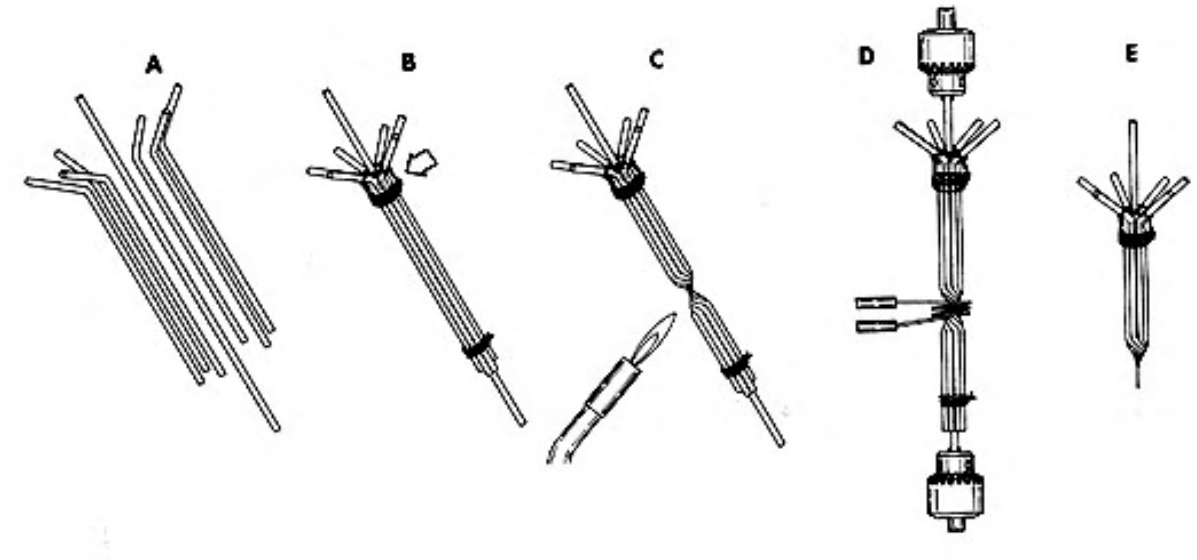


Figure 34 : Principe de fabrication des pipettes multicanaux (D'après Reader, 1978).

La pipette multicanaux est ensuite accolée à l'électrode d'enregistrement après alignement des pointes sous contrôle binoculaire (x128). La pointe multicanaux est placée en retrait de l'extrémité de l'électrode d'enregistrement d'environ 10 à 15 µm (configuration "piggy back"). Ceci permet de limiter les artefacts dus au passage des courants d'iontophorèse et améliore le rapport signal/bruit de l'enregistrement (Stone 1985). Les pointes sont ensuite solidarisées avec une résine dentaire photo-polymérisable (Scotchbond Multipurpose, 3M). Une étaie joignant les parties supérieures des tubes renforce l'ensemble (Figure 35).

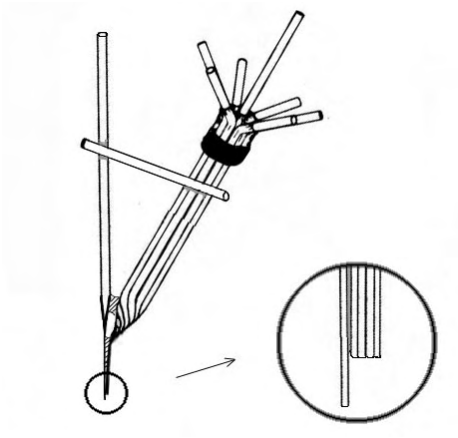


Figure 35. Assemblage d'une électrode d'enregistrement et d'une pipette multicanaux. La pipette multicanaux est placée en retrait de la pointe d'électrode d'enregistrement de 15 à 20 µm (configuration "piggy-back" ; d'après (Gervasoni 2000).

B - Préparation des solutions

Les substances testées ont été dissoutes dans de l'eau distillée ou bifiltrée. De faibles concentrations ont été utilisées pour les drogues peu solubles. Le pH de chacune des solutions est vérifié à l'aide de papier pH (Acilit ou Neutralit, précision 0.5 unité pH, MERCK) et ajusté à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl, 0.1 et 1 N) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH, 0.1 et 1 N).

Chaque canal de la pipette rempli avec des solutions pharmacologiques est relié à un module générateur (BIONIC INSTRUMENTS) permettant d'ajuster et de visualiser les intensités des courants d'éjection. Afin de réduire la diffusion passive des substances testées (due notamment au gradient de concentration), un courant de rétention de 5 à 10 nA est appliqué en dehors des périodes d'éjections.

Les techniques de traçage de voies

I. Le traçage rétrograde de voies nerveuses

A - Principes du traçage rétrograde de voies nerveuses

Le traçage rétrograde repose sur la capacité des neurones à capter par leurs terminaisons certaines molécules, puis à les transporter rétrogradement jusqu'à leur corps cellulaire où elles s'accumulent (voir (Luppi et coll. 1990) pour revue). Après un temps de survie nécessaire à ce transport, la présence du traceur est révélée par immunohistochimie.

Le choix du traceur est crucial et il dépend des paramètres suivants :

- sa sensibilité. Plus le traceur sera sensible, plus le marquage rétrograde sera complet.
- sa spécificité. Le traceur ne doit pas être capté par des fibres de passage, ni franchir les synapses.
- son mode d'injection in situ. Le traceur doit pouvoir être injecté avec des sites d'injection de taille restreinte sans pour autant avoir de perte de traçage et également sans lésion du tissu.

Pour nos études neuroanatomiques, nous avons choisi d'utiliser la sous-unité B de la toxine cholérique, ou CTb. En effet, ce traceur, dont les techniques d'éjection et des révélations ont été élaborées par Luppi et coll. (1990)., demeure aujourd'hui encore l'un des plus sensibles et il répond parfaitement aux exigences citées ci-dessus.

De plus, nous avons également utilisé le Fluorogold, traceur s’éjectant facilement par iontophorèse et ayant la particularité d’être naturellement fluorescent.

B - La sous-unité B de la toxine cholérique

La CTb est une protéine de 11.5 KDa qui se fixe spécifiquement sur des glycoconjugués, les monogangliosides GM1, présents en grand nombre au niveau de la membrane des neurones. De ce fait, la CTb a une diffusion restreinte et une grande quantité du traceur est captée au niveau du site. Une fois fixée, la CTb est internalisée, puis transportée rétrogradement et antérogradement à l'intérieur du neurone (Stoeckel et coll. 1977; Trojanowski 1983).

La CTb est un traceur non trans-synaptique dont la grande sensibilité comme traceur rétrograde a été démontrée à maintes reprises, mettant dans de nombreux cas en évidence des afférences nouvelles pour des structures déjà étudiées comme par exemple le LC (Luppi et coll., 1995). Notre laboratoire a d'ailleurs publié plusieurs articles ses dernières années avec cette technique que nous utilisons pour nos études neuroanatomiques (Peyron et coll. 1995; Peyron et coll. 1996; Rampon et coll., 1996; Rampon et coll., 1996; Gervasoni et coll., 1998; Peyron et coll. 1998; Rampon et coll., 1999; Boissard et coll. 2000; Gervasoni 2000; Boissard et coll., 2003).

La CTb présente également l'avantage de ne pas être captée par les fibres de passage non lésées. Enfin, la CTb peut être injectée par iontophorèse.

La révélation de la CTb par les méthodes classiques d'immunohistochimie fait apparaître un marquage cytoplasmique granulaire. Ce marquage granulaire permet de coupler la révélation de la CTb avec celle de neurotransmetteurs comme l'Ach, le GABA ou la Gly (Peyron et coll., 1995; Peyron et coll., 1996; Rampon et coll., 1996; Rampon et coll., 1996; Gervasoni et coll., 1998; Peyron et coll., 1998; Rampon et coll., 1999; Boissard et coll., 2000; Gervasoni 2000; Boissard et coll., 2003) ou de protéine nucléaire comme le Fos (Morales et coll. 1999).

C – Le Fluorogold

Le Fluorogold a été introduit par Schmued et Fallon en 1986 (Schmued et Fallon 1986). Ce traceur rétrograde, directement fluorescent, n’est pas trans-synaptique et n’est pas capté par les fibres de passages.

A l’instar de la CTb, il est possible d’éjecter le Fluorogold par iontophorèse (Pieribone et Aston-Jones 1988), et ainsi d’obtenir des sites restreints.

De plus, il a été montré qu’après une période de survie de 15 jours, des neurones rétrogradement marqués étaient visibles dans l’ensemble du névraxe (Schmued et Fallon 1986).

Enfin, il est également possible de coupler le marquage obtenu avec le fluorogold avec l’immunohistochimie de différents neurotransmetteurs (Ju et coll. 1989).

II. Le traçage antérograde de voies nerveuses

A - Principes du traçage antérograde de voies nerveuses

Le traçage antérograde est utilisé pour déterminer les cibles d'une population neuronale donnée. Le traceur est capté par les corps cellulaires et transporté, le plus souvent, le long de l'axone de manière active, à l'intérieur de vésicules. Ainsi, un transport axonal rapide peut atteindre une vitesse d'environ 2cm/jour (voir (Kobbert et coll. 2000) pour revue). Après un temps de survie nécessaire à ce transport, la présence du traceur est révélée par immunohistochimie.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser la PHA-L (leucoagglutinine du phaseolus vulgaris), l'un des traceurs antérogrades les plus sensible.

B - La leucoagglutinine du Phaseolus vulgaris

La technique du traçage antérograde par la PHA-L a été mise au point par Gerfen et Sawchenko (1984). D'après leurs travaux, la PHA-L satisfait nombre de critères importants pour le traçage de voies :

- une grande sensibilité.
- un marquage de type Golgi qui remplit pleinement les axones.
- une possibilité d'éjection par micro-iontophorèse et donc une absence de lésion des fibres de passage.
- une absence de capture par les fibres de passage ;
- la distinction entre les fibres de passages et celles à boutons terminaux.

La PHA-L est une lectine extraite de haricots rouges, pesant 126 KDa et ayant notamment la capacité de stimuler la croissance et la division des lymphocytes et d'agglutiner les cellules sanguines. Elle est composée de deux sous unités, les formes E et L, qui ont respectivement la capacité d'agglutiner préférentiellement les érythrocytes ou les leucocytes. Les lectines présentent la particularité de se fixer à divers glycoprotéines et glycolipides présents à la surface de la membrane des neurones. Elles sont alors internalisées, puis transportées rétrogradement et antérogradement. Néanmoins, les études faites avec la PHA-L montrent qu'elle n'est pas un traceur rétrograde (Gerfen et Sawchenko 1984). A la différence de la CTb, les sites d'injection de PHA-L sont souvent entourés d'une zone de marquage diffus. Il est

alors difficile de connaître précisément l'étendue du site d'injection et donc le volume du tissu qui a capté le traceur. Mais il n'en reste pas moins que la PHA-L reste aujourd'hui le traceur antérograde le plus utilisé en neuroanatomie. Les différents travaux ont montré que le traçage antérograde au moyen de la PHA-L pouvait être couplé à l'immunohistochimie de différents neurotransmetteurs comme le GABA ou la Gly (Luppi et coll., 1995; Peyron et coll., 1998). D'autres travaux ont également montré l'intérêt du couplage de la PHA-L avec un marqueur fonctionnel comme le C-Fos pour comprendre le fonctionnement d'un réseau par stimulations chimique ou électrique (Wan et coll. 1992; Rizvi et coll. 1996).

III. Mise en œuvre

Afin de déterminer les afférences et efférences aux structures étudiées, nous avons utilisé les trois traceurs préparés selon le protocole suivant:

- **CTb** : La CTb lyophilisée (500µg) est reconstituée dans 100µL de tampon phosphate (PB) 0,1M ph 6. Cette préparation donne une solution où la CTb est chargée positivement, pouvant ainsi être injectée par iontophorèse.
- **Fluorogold** : Le Fg lyophilisé (1mg) est reconstitute dans 50µL de NaCl 0.9%. Cette préparation donne une solution où le Fg est chargée positivement, pouvant ainsi être injectée par iontophorèse.
- **PHA-L** : La PHA-L lyophilisée (5mg) est reconstituée dans 200µL d'une solution PB 0,01M contenant 0,5% de NaCl 0,9% à pH 8. Cette préparation donne une solution où la PHA-L est chargée positivement, pouvant ainsi être injectée par iontophorèse.

Les traceurs sont éjectés par iontophorèse, soit chez l'animal vigile en contention, soit chez l'animal anesthésié (comme c'est le cas pour l'étude neuroanatomique du DPGi).
Dans tous les cas, nous procédons à l'éjection iontophorétique des traceurs suivant le protocole suivant :

- **CTb** : 15 min alternatif (7sec on / 7sec off) à une intensité de +1µA.
- **Fluorogold** : 15 min alternatif (7sec on / 7sec off) à une intensité de +5µA.
- **PHA-L** : 10 min alternatif (7sec on / 7sec off) suivi de 10 min continu à une intensité de +5µA.

Nous considérons le traçage effectif après 10j de survie. Les rats peuvent donc être sacrifiés pour une révélation immuno-histochimique ultérieure.

Privation et rebond de SP

Il est bien démontré, chez le chat et surtout chez le rat, que toute privation spécifique de SP est suivie d'une phase de récupération pendant laquelle la dette en SP est remboursée. Plusieurs protocoles de privation spécifique de SP ont été mis au point, présentant chacun des intérêts et des inconvénients spécifiques.

Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser la méthode dite de la piscine. Cette technique, maîtrisée au sein du laboratoire, a déjà démontré son utilité pour l'étude des réseaux neuronaux responsables de la régulation du SP (Verret et coll. 2003; Verret et coll., 2005).

Le rat est posé sur une plate-forme entourée d'eau. Cette plate-forme est de taille suffisante pour que l'animal puisse s'y maintenir et s'endormir en SL. En revanche, sa taille est insuffisante pour permettre à l'animal d'effectuer du SP (du fait de l'atonie musculaire caractérisant cet état).

Le protocole de privation et de rebond de SP se déroule sur environ 10 jours pour une série expérimentale. Durant 5 à 6 jours, les rats sont tout d'abord habitués aux conditions expérimentales. Ils sont placés, dans des barils individuels dans la chambre d'enregistrement présentant une alternance lumière/obscurité (12h-12h, avec allumage à 6h) et une température contrôlée (23 ± 1°C).

Les rats sont ensuite répartis en 3 groupes expérimentaux différents:

1) les rats témoins (PSC) qui restent dans les conditions standards d'hébergement décrites précédemment jusqu'à leur sacrifice le dernier jour.

2) les rats privés de SP (PSD) jusqu'au terme de l'expérimentation.

3) les rats rebonds (PSR), autorisés à récupérer suite à la privation spécifique.

Après l'habituation, les animaux PSD et PSR sont alors placés sur une plate-forme de 6,5cm de diamètre émergeant d'environ 1cm au-dessus de la surface de l'eau. Une mangeoire et un biberon d'eau sont installés de manière à ce que les animaux puissent facilement atteindre nourriture et boisson durant toute la durée de la privation (Figure 36). Durant les 3 jours de privation de SP, les rats sont tous les jours transférés de leur plate-forme vers un baril classique le temps que le baril de privation soit nettoyé et l'eau changée.

Figure 36 : Photographie d'un rat lors d'une privation spécifique de SP par la méthode de la piscine.

Soixante-douze heures après le début de la privation, le rat rebond est replacé dans un baril avec une litière propre pour la récupération de SP. Lorsque le rat est replacé dans son baril d'origine, il suit une période d'éveil d'environ 30-40min consécutive au changement d'environnement. Durant ce laps de temps, l'animal procède à une observation des lieux et surtout à une toilette générale. Puis il se calme, s'endort, et commence alors le rebond de SP proprement dit. Trois heures après la fin de la privation, l'animal est profondément anesthésié au pentobarbital monosodique (150mg/kg en IP) et rapidement perfusé. En conséquence et conformément à la cinétique de la protéine Fos, les neurones exprimant Fos observés pour ces animaux reflèteront leur activation lors du rebond de SP. Les rats témoins et privés sont alors successivement euthanasiés.

L'utilisation d'un marqueur fonctionnel : la protéine Fos

I. Intérêt des marqueurs fonctionnels

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de traceurs permet de déterminer les efférences et les afférences à une structure donnée. Cependant, il est indispensable de savoir parmi ces efférences/afférences, lesquelles sont spécifiquement actives durant le SP.
Un moyen de répondre à cette question est l'utilisation de marqueur de l'activité cellulaire comme le proto-oncogène C-Fos. En effet, Sagar et coll. (1988) ont montré que l'expression de la protéine de ce gène traduit l'activation d'une cellule par un stimulus. Le C-Fos fait partie de la famille des gènes précoces. Ces gènes ont une transcription qui est rapidement induite par une stimulation extracellulaire (Morgan et Curran 1986; Morgan et Curran 1989; Morgan 1990; Morgan et Curran 1991) pour réguler la transcription d'un gène cible (Kerppola et Curran 1991).

II. Mécanismes de synthèse de la protéine Fos

Les réponses du neurone aux diverses stimulations dont il est en permanence le sujet sont réparties en deux classes : les réponses précoces et les réponses tardives (revue dans (Hughes et Dragunow 1995)). La réponse précoce survient de quelques millisecondes à quelques minutes après la stimulation. Elle résulte de l'interaction entre des premiers messages extracellulaires (neurotransmetteurs ou facteurs de croissance) avec des récepteurs de surface, interaction dont la résultante est l'activation de seconds messagers intracellulaires. Ce mécanisme passe soit par l'activation de récepteurs ionotropiques, soit par l'activation de récepteurs métabotropiques. La résultante en est une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium qui peuvent alors agir sur des protéines kinases. Ces protéines kinases vont alors activer des protéines spécifiques par phosphorylation. La durée de la réponse neuronale dépend alors de la persistance de cette phosphorylation (généralement courte du fait d’une régulation par des phosphatases).
La réponse tardive survient dans une fenêtre de quelques heures à quelques jours et, dans certaines circonstances, cette réponse peut devenir permanente comme c'est le cas dans les mécanismes d'apprentissage ou de mémoire. Des modifications de l'expression génomiques

sont nécessaires pour ce type de réponse. Ces modifications surviennent soit par des mécanismes directs (le complexe hormone stéroïde-récepteur), soit par des mécanismes indirectes (action d'un second messager). Ces modifications sont le fait de molécules regroupées sous l'appellation de "molécules effectrices liant l'ADN" (DNA binding effector molecules). S'en suit la production d'un ARNm spécifique et de la protéine associée qui va alors modifier le phénotype de la cellule. Les gènes codant pour ces protéines sont dénommés gènes de réponse tardive (late-response genes).

Dans notre cas, la transcription de l'ARNm c-fos atteint un pic entre trente et soixante minutes après le stimulus, alors que le taux maximal de la protéine Fos s'observe entre une et trois heures après cette stimulation (Dragunow et Faull 1989). La visualisation de la protéine Fos par immunohistochimie chez un animal sacrifié dans les heures qui suivent un stimulus permet donc de tracer à l'échelle cellulaire les réseaux neuronaux recrutés par cette stimulation.

III. C-Fos et cycle veille-sommeil

L'immunohistochimie du Fos a été utilisée dans de nombreuses études du cycle veille-sommeil et particulièrement du SP. Différentes études ont notamment montré que l'expression de C-Fos est modulée par les états de vigilance (pour revue, voir (Tononi et Cirelli 2001). Ainsi quand l'animal est endormi les 3 à 8 heures qui précèdent son sacrifice, l'expression de C-Fos est faible voire nulle dans la plupart des régions cérébrales. A contrario, son expression est forte dans la plupart des régions cérébrales si l'animal est éveillé spontanément ou privé de sommeil.

D'autres travaux ont combiné chez le rat l'immunohistochimie du Fos suite à un rebond de SP avec l'immunohistochimie de neurones cholinergiques, monoaminergiques et GABAergiques (Maloney et coll., 1999; Maloney et coll. 2000; Maloney et coll. 2002; Verret et coll., 2005). Cette approche a permis d'identifier la nature et la localisation de certains neurones actifs spécifiquement au cours du SP.

Enfin, Verret et Coll., (2006) ont également démontré l'intérêt du C-Fos couplé à l'immunohistochimie d'un traceur rétrograde (la CTb) afin de mieux comprendre les réseaux neuronaux à l'origine de la régulation, au cours des états de vigilance, d'une structure cérébrale donnée.

Ces données montrent l'intérêt de l'utilisation de l'immunohistochimie du Fos pour une approche plus fonctionnelle des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du cycle veille-sommeil, et particulièrement du SP.

Perfusion et préparation histologique

I. Perfusion

Les animaux sont anésthésiés puis perfusés à travers l'aorte ascendante avec 100ml d'une solution à température ambiante de Ringer-lactate héparinée à 0,1%, puis avec 500ml d'une solution de fixation froide. La solution de fixation est composée de PB 0,1M à pH=7,4 contenant 4% de paraformaldéhyde.
A la fin de la perfusion, le cerveau est prélevé puis plongé dans une solution de PB 0,1M contenant 30% de saccharose pendant au moins 3 jours à 4°C, dans le but de préserver le tissu lors de la congélation.

II. Réalisation et conservation des coupes histologiques

Pour la réalisation des coupes histologiques, les cerveaux sont congelés à la neige carbonique. Ils sont ensuite entièrement sectionnés au cryostat (Leitz) dans une enceinte à -25°C en coupes frontales sériées de 25µm d'épaisseur, depuis le cortex frontal jusqu'à la partie la plus rostrale de la moëlle épinière. Ces coupes flottantes sont recueillies dans une solution de tampon phosphate PB 0,1M à pH=7,4 contenant 0,9% de NaCl et 0,3% de Triton X-100 (PBST).
Après avoir été récupérées, les coupes sont rincées deux fois 30min à température ambiante, puis sont conservées à 4°C dans une solution de PBST contenant 0,1% d'azide de sodium (PBST-Az). L'azide de sodium est un agent antibactérien qui assure une bonne conservation des tissus.

III. Immunohistochimie

A - Principe

L'immunohistochimie est une technique qui permet de révéler sur un échantillon de tissu post-mortem la présence d'un marqueur donné (l'antigène) de nature endogène, comme un

neurotransmetteur, une enzyme de synthèse, une protéine nucléaire ou membranaire, ou de nature exogène, comme c'est le cas pour un traceur rétrograde ou antérograde (figure 37).

Cette technique consiste à fixer sur l'antigène d'intérêt un anticorps, monoclonal ou polyclonal, qui lui est spécifique, dit anticorps primaire. La présence de celui-ci est révélée par un système de marquage utilisant des composés colorés visualisables par microscopie en lumière transmise ou à florescence.

Dans le cas où le composé coloré est fixé directement sur l'anticorps primaire, la technique est dite d'immunohistochimie directe. Cependant, dans le but d'augmenter la sensibilité de la réaction, un second anticorps - ou anticorps secondaire - dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit peut être utilisé. Il s'agit alors d'une technique d'immunohistochimie indirecte. Ces anticorps secondaires sont polyclonaux et peuvent donc se fixer sur différents épitopes de l'anticorps primaire. Le système de coloration étant porté par les anticorps secondaires, une plus grande quantité de marqueur coloré est fixée par anticorps primaire.

La technique de révélation la plus couramment utilisée en microscopie optique exploite les propriétés enzymatiques de la péroxydase du Raifort (Horse Radish Peroxydase, HRP). La HRP transforme son substrat, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O), libérant ainsi un proton (H^+). Cet ion hydrogène oxyde alors la molécule de révélation choisie, qui a pour propriété de changer de couleur sous sa forme oxydée.

Les travaux présentés ici ont été réalisés grâce à l'utilisation de la 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) qui, en présence de protons, donne un précipité marron insoluble (technique DAB simple). Si du sulfate d'ammonium nickel est ajouté à la solution de révélation, alors le précipité obtenu est de couleur bleue-noire (technique DAB-Ni). Cette possibilité d'obtention de deux couleurs facilement distinguables au microscope optique permet d'effectuer des doubles marquages sur un même tissu.

Dans le but d'accroître la qualité et la sensibilité des méthodes de révélation indirectes, le moyen de fixation du système de coloration par la HRP sur l'anticorps secondaire a été perfectionné. Ainsi, une procédure utilisant la très forte affinité de l'avidine pour la molécule de biotine a été introduite par Hsu (1981) (Hsu et coll. 1981). Cette technique nécessite l'emploi d'anticorps secondaires portant plusieurs molécules de biotine sur lesquels vient se lier de manière extrêmement stable un composé d'avidine et de HRP. L'avidine possède quatre sites de liaison pour la biotine mais, du fait de l'encombrement stérique du complexe ainsi formé, le nombre de molécules de biotine qui se fixent est inférieur à quatre. C'est pourquoi une nouvelle génération de complexes avidine-biotine (ABC) couplés à la HRP a été

élaborée. La HRP n'est alors pas liée de façon covalente directement à l'avidine mais par l'intermédiaire de la biotine. Ainsi un plus grand nombre de molécules d'enzyme peut se fixer sur le complexe ABC, amplifiant encore l'intensité de la réaction immunohistochimique :

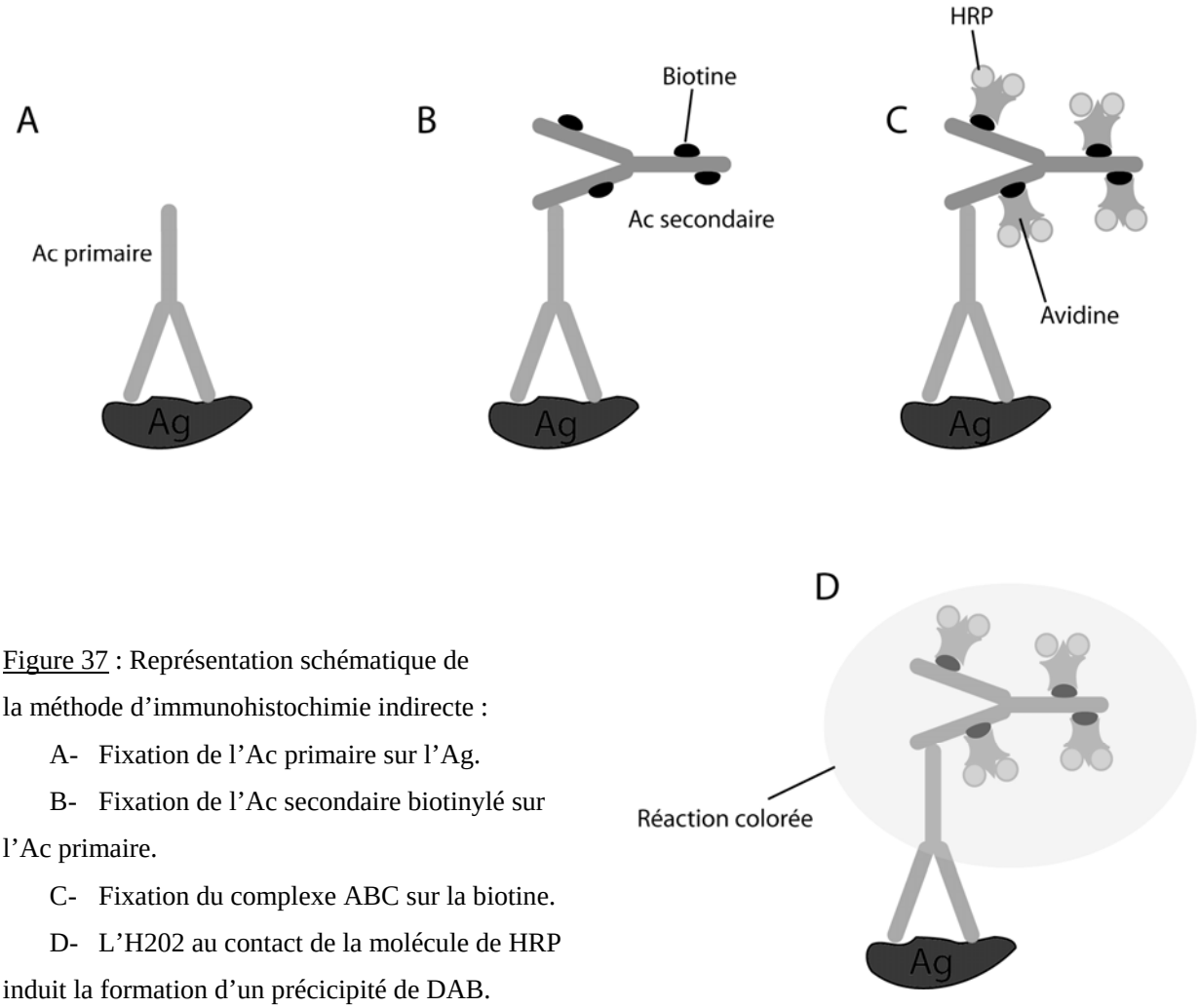


Figure 37 : Représentation schématique de la méthode d'immunohistochimie indirecte :

A- Fixation de l'Ac primaire sur l'Ag.

B- Fixation de l'Ac secondaire biotinylé sur l'Ac primaire.

C- Fixation du complexe ABC sur la biotine.

D- L'H202 au contact de la molécule de HRP induit la formation d'un précicipité de DAB.

B - Protocole expérimental général

Pour la totalité des doubles marquages immuno-histochimiques réalisés dans ce travail, la procédure suivante est entièrement exécutée une première fois en utilisant la DAB-Ni comme chromogène.

Elle est alors suivie de plusieurs rinçages. Après un minimum d'une nuit de délai, elle est réalisée une deuxième fois mais en employant la DAB simple comme chromogène.

Les coupes flottantes subissent ainsi successivement les traitements suivants :

- Une incubation dans une solution de PBST-Az et d'anticorps primaires dirigés spécifiquement contre l'antigène à détecter pendant 3 jours sur agitateur à 4°C
- Deux rinçages de 30 min dans du PBST à température ambiante et sous agitation permanente;
- Une incubation dans une solution de PBST et d'anticorps secondaires biotinylés en excès dirigés contre l'espèce animale chez laquelle l'anticorps primaire a été conçu, pendant 90min sur agitateur et à température ambiante;
- Deux rinçages de 30min dans du PBST à température ambiante et sous agitation permanente;
- Une incubation dans une solution de PBST contenant le complexe ABC-HRP pendant 90min sur agitateur et à température ambiante;
- Deux rinçages de 30min dans du PBST à température ambiante et sous agitation permanente;
- Incubation dans une solution de Tris-HCl 0,05M à pH=7,6 contenant 0,02% de DAB, 0,6% de sulfate d'ammonium et de nickel, et 0,003% de H_2O_2. La réaction, d'une durée maximale de 30min, se déroule à température ambiante. L'intensité et le contraste (rapport signal spécifique/bruit de fond) de la réaction sont régulièrement contrôlés sous microscope. Lorsque la réaction est jugée optimale, elle est arrêtée par plusieurs rinçages successifs avec une solution PBST-Az. En effet, l'action enzymatique de la HRP est fortement inactivée en présence d'azide.

Analyse des données expérimentales

I. Données polysomnographiques

Les enregistrements sont soumis à une analyse visuelle semi-automatique à l'aide d'un script développé sous *Spike 2* au sein du laboratoire. Ce script permet d'effectuer une lecture séquentielle de chaque enregistrement numérique par plages de 10 ou 2 secondes en visualisant le spectre de fréquence de l'EEG. L'expérimentateur affecte alors un stade à chaque période considérée selon les critères décrits précédemment.

II. Données électrophysiologiques

La fréquence et le mode de décharge des neurones sont mesurés en temps différé pour chaque état de vigilance à l'aide du logiciel d'analyse Spike 2.
De manière générale, les fréquences moyennes de décharge sont mesurées pendant au minimum 3 épisodes de 10sec d'EV, de SL et de SP et comparées en utilisant un test ANOVA suivi d'un test a posteriori PLSD de Fisher. Les modes de décharge des neurones du DPGi sont appréciés à l'aide des histogrammes d'intervalles entre potentiels d'action et des autocorrélogrammes. Les autocorrélogrammes (ACs) tiennent compte de l'organisation temporelle des PA successifs et constituent une méthode standard utilisée pour détecter des périodicités ou des singularités au sein d'un train de PA (Pernier et Gerin 1975). Les méthodes d'analyses plus spécifiques seront décrites en détail au sein des chapitres concernés.
Les données numériques sont fournies sous la forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne et le seuil de significativité des tests statistiques a été fixé à $P \leq 0,05$.

III. Données Pharmacologiques

Afin de mettre en évidence une éventuelle modification du rythme veille-sommeil, nous avons analysé les éjections substance pharmacologiquement actives (et ce durant une période d'au moins 1h après l'éjection). L'effet est alors estimé en analysant ces éjections comparées à

celle de NaCl, utilisé comme témoin. Les résultats sont représentés par le pourcentage des différents états de vigilance pour le témoin et pour l'éjection pharmacologique.
Les quantités des différents états de vigilance sont ensuite comparées en utilisant un test ANOVA suivi d'un test a posteriori PLSD de Fisher.

IV. Histologie

Les analyses quantitatives des données anatomiques et les cartographies ont été réalisées avec l'aide de logiciels d'analyse d'image (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France). Les coupes sont visualisées avec un microscope dont la platine est équipée de capteurs de coordonnées en X et en Y et d'une caméra vidéo connectée à un moniteur.
Ce système permet de dessiner à faible grossissement (x 2,5) le contour des coupes et les structures anatomiques, de pointer les différents types de neurones marqués à plus fort grossissement (x 10, x 16 et x 20). Les cartographies obtenues sont ensuite exportées vers le logiciel Adobe Illustrator CS, où elles sont mises en page. Le logiciel Mercator permet également de compter le nombre de neurones pointés de chaque catégorie ainsi que la structure dans laquelle ils se trouvent. Les résultats sont alors exportés sous format texte, permettant une analyse plus fine grâce au tableur Excel.

Chapitre 1 :

Régulation cholinergique du sommeil paradoxal chez la souris

Introduction

Depuis le début des années 1960, l'acétylcholine est considérée comme l'un des principaux neurotransmetteurs impliqué dans la régulation du SP (Jouvet 1967).

Il a en effet été démontré que l'injection d'agonistes cholinergiques (carbachol ou bethanecol) ou d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine) au sein du tegmentum pontique dorsal chez le chat induisait une forte augmentation des quantités de SP (augmentation supérieure à 500%) (Vanni-Mercier et coll., 1989), cette hypersomnie en SP pouvant être prévenue par l'éjection d'antagonistes muscariniques (atropine ou scopolamine) (Baghdoyan et coll., 1989). Il a enfin été montré, grâce à l'utilisation d'antagonistes sélectifs des différents sous types de récepteurs muscariniques, que cet effet du carbachol serait dû à l'activation de récepteurs M3 (Sakai et Onoe 1997) ou M2 (Velazquez-Moctezuma et coll. 1989; Baghdoyan et Lydic 1999).

Chez le rat, le rôle de l'acétylcholine dans la régulation du SP fait encore l'objet d'un débat. En effet, l'injection de carbachol dans le tegmentum pontique dorsal du rat n'induit qu'une faible, voir aucune, augmentation des quantités de SP (Gnadt et Pegram 1986; Bourgin et coll., 1995; Deurveilher et coll., 1997; Boissard et coll., 2002).

Chez la souris, des données contradictoires ont été obtenues. Si il a été montré une augmentation des quantités de SP suite à l'injection de carbachol (Lydic et coll. 2002) médiée par les récepteurs M2 (Coleman et coll., 2004), une étude récente remet en cause ces résultats. En effet, Pollock et Coll., (2005) ont démontré que l'effet obtenu suite à l'injection de néostigmine (inhibiteur des cholinestérases) chez la souris correspondait en fait à une augmentation des quantités d'EV et non de SP.

La disponibilité de souris spécifiquement invalidées pour les récepteurs muscariniques de types M2, M3, M4 et doublement invalidées pour les récepteurs M2/M4 nous est apparue comme une approche de choix afin d'éclaircir le rôle de l'acétylcholine dans la régulation physiologique du SP chez la souris. Pour ce faire, nous avons tout d'abord quantifié les différents états de vigilance chez les souris KO et chez leurs témoins respectifs.

Par ailleurs, il est classiquement admis que le rythme thêta, prédominant durant le SP, est dépendant des neurones cholinergiques et GABAergiques du septum médian qui projettent sur l'hippocampe. De plus, l'Ach agirait, au niveau de l'hippocampe, via des récepteurs de types muscariniques : l'induction de thêta observée suite à l'application de carbachol au niveau de l'hippocampe *in-vitro* serait médiée par les récepteurs M2 et M4 (Monmaur et coll. 1994).

Afin de vérifier cette hypothèse, mais également de clarifier le rôle des différents sous-types de récepteurs muscariniques dans la régulation du rythme thêta *in-vivo*, nous avons caractérisé ce rythme particulier au cours de l'EV et du SP chez les souris KO et leurs témoins respectifs.

Ce travail fait l'objet d'un article publié dans *Neuropsychobiology*.

Original Paper

Neuropsychobiology

Neuropschychobiology 2005;52:140–146
DOI: 10.1159/000087560

Published online: August 17, 2005

Paradoxical Sleep in Mice Lacking M_3 and M_2/M_4 Muscarinic Receptors

Romain Goutagny[a] Jean-Christophe Comte[a] Denise Salvert[a]
Jesus Gomeza[b] Masahisa Yamada[b] Jürgen Wess[b] Pierre-Hervé Luppi[a]
Patrice Fort[a]

[a]CNRS UMR 5167, Physiopathologie des Réseaux Neuronaux du Cycle Veille-Sommeil, Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon (IFR19), Université C. Bernard, Lyon, France, [b]Laboratory of Bioorganic Chemistry, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, Md., USA

Key Words
Paradoxical sleep · Waking · Cholinergic · Brainstem · EEG · Theta rhythm

Abstract
Acetylcholine is crucial for the regulation of paradoxical sleep (PS) and EEG theta activity. To determine the contribution of individual muscarinic receptors to these events, we analyzed the sleep-waking cycle and EEG activities of mice lacking functional M_3 or M_2/M_4 receptors. Daily PS amounts were significantly decreased in M3–/– (–22%) but not in M2/M4–/– mice. Further, the theta peak frequency for PS was significantly increased in both M2/M4–/– and M3–/– mice. This study supports the potential role of M_3 rather than M_2 and M_4 muscarinic receptors in the modulation of PS in mice and strengthens the idea that multiple muscarinic receptors contribute to the regulation of the EEG theta activity during PS.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Introduction

Since the early 1960s, acetylcholine is believed to be the primary neuromodulator for paradoxical sleep (PS) [1]. Particularly convincing evidence comes from microinjection studies showing that in cats the dorsal pontine tegmentum is the most efficient, or even the unique brain area where direct administration of cholinergic agonists (carbachol or bethanecol) or acetylcholinesterase inhibitors (neostigmine) produces very high quantities (>500% increase) of a state resembling natural PS [2]. Such PS hypersomnia can be prevented by muscarinic antagonists atropine or scopolamine [3]. Moreover, one study using muscarinic antagonists suggested that the carbachol-induced PS hypersomnia in cats might be mediated by M_3 muscarinic receptors expressed by neurons of the dorsal pontine tegmentum [4]. However, other works reported that M_2 receptors also play a role in this activity [5, 6]. In the rat, the role of acetylcholine in PS remains a matter of debate. Most studies have had limited success replicating the feline cholinergically-induced PS hypersomnia. Carbachol administration in the rat dorsal pontine tegmentum either fails to consistently increase PS or causes PS increases of only 50% above control levels, without increase in the duration of PS bouts and decrease in latency to PS onset [7–10]. Binding assays, autoradiographic and pharmacological studies suggested that pontine M_2 muscarinic receptors are important for PS in rats [11, 12]. It is likely that the limited receptor subtype selectivity of the available muscarinic agonists and antagonists is the primary reason for the discrepant results between species [13].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
0302–282X/05/0523–0140$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/nps

Patrice Fort
CNRS UMR 5167, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 7 rue Guillaume Paradin
FR–69372 Lyon, Cedex 08 (France)
Tel. +33 4 78 77 10 41, Fax +33 4 78 77 10 22
E-Mail patrice.fort@sommeil.univ-lyon1.fr

With regard to mice, very scarce data are available on the cholinergic regulation of PS. Recent studies succeeded in producing a PS hypersomnia [14], mediated by brainstem M_2 receptors, in mice [12]. Mutant mouse strains deficient in individual muscarinic receptors have become available as novel experimental tools for investigating in this species the mechanisms gating PS [15]. Accordingly, our preliminary data based on small samples of mice deleted for M_2, M_4, M_2/M_4 or M_3 receptors, albeit suggesting that PS remained normally regulated, have shown a trend toward increased peak frequency of the theta EEG activity in M3–/– and M2/M4–/– mice [16]. In this study, we thus pursued in these two lines of transgenic mice the examination of the vigilance states and theta EEG activity by a fast Fourier transform (FFT) analysis.

Materials and Methods

Surgery and Polygraphic Recordings

The generation of M3–/– [17] and M2/M4–/– mice [18] has been described previously. All experiments were carried out with age-matched male mice (10–14 weeks, n = 6 for each group of M3–/–, M3+/+, M2/M4–/– and M2/M4+/+ mice). As reported previously [17], M3–/– mice were leaner than their WT controls (28.5 ± 1.1 vs. 31.3 ± 1.4 g for M3–/– and M3+/+ before surgery; p = 0.14). To monitor the sleep-waking cycle, animals were conventionally implanted under anesthesia (20 mg/kg sodium pentobarbital) with 3 cortical stainless steel screws and 3 neck muscle stainless wires to record EEG and EMG signals. Since EEG characteristics differ depending on cortical electrode sites, their location was standardized across all mice. They were inserted into the dura through holes made in the skull, located in the right frontal (1 mm lateral and anterior to Bregma) and bilaterally in parietal (1 mm lateral to the midline at the midpoint between Bregma and Lambda, above hippocampus) cortices. All electrodes were soldered to a connector secured to the skull using dental acrylic cement. Then, the mice were allowed for recovery in individual plexiglas jars placed in an insulated sound-proofed recording box under standard laboratory conditions: 12/12-hour light-dark cycle with light on at 5:00 a.m., 22–24°C ambient temperature, food pellets (Extra Labo, Lyon, France) and water ad libitum. For habituation to the experimental conditions, mice were connected to a rotating collector for 5 days. Both EEG and EMG signals were amplified, digitized at 250 Hz and collected on an Apple computer via a CED-1401 Plus interface using the Spike-2 software (Cambridge Electronic Design, UK).

Sleep Scoring and Analysis

For all mice, the 24-hour polygraphic recording of the day 10 after the implantation was analyzed offline by the same observer who was blinded to the genotype. According to standard procedures of murine sleep analysis [19, 20], the vigilance states were scored from 10-second epochs as waking (W), slow wave sleep (SWS) or PS by visual examination of polygraphic signals and the help of a sliding window showing the EEG power spectrum analyzed during the same 10-second epoch by FFT. During W, activated low amplitude EEG was accompanied by a sustained EMG activity with phasic bursts. SWS was clearly distinguished by high-voltage slow waves and spindles and disappearance of phasic muscle activity in an immobile animal with eyes closed. A decrease in the EEG amplitude associated with a flat EMG (muscle atonia) and a regular and pronounced theta rhythm (theta band activity between 4 and 8 Hz) signaled the onset of PS episodes. Hypnograms were then drawn directly using a custom script in Spike-2. The values were finally used to calculate the standard parameters for each vigilance state (quantities, percentage, number and duration of bouts) over a 24-hour cycle and 12-hour light/dark phases (LP and DP). Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA) for the factor genotype. In case of significance ($p < 0.05$), the F test was followed by a post hoc PLSD Fisher test to identify significant pairwise differences.

EEG Rhythmic Activities during W and PS

For this purpose, we reproduced a recently performed procedure in mice aimed at precisely analyzing EEG signals across the sleep-waking cycle [20, 21]. Then, an FFT routine was applied to obtain in each mouse the EEG power spectrum (frequency band activities from 0.8 to 47.6 Hz, with 0.24-Hz bin resolution) of 40 artifact-free epochs (5 s) of W and PS recorded during the LP and DP. The epochs were extracted from the same period of the polygraphic recordings, limited to the 3 h that immediately followed the light switch on/off (5–8 p.m. for the DP and 5–8 a.m. for the LP). This procedure likely limited the analysis to a small percentage of daily PS and W quantities but took into account the potential circadian modulation in EEG activities [20]. Indeed, our pilot study failed to observe any circadian modulation of the EEG activities in the same mice by considering all PS and W epochs over 24 h and 12-hour LP and DP [16]. To determine the theta peak frequency (TPF), we considered the spectral band between 4–9 Hz as a statistical distribution following a Gaussian law. Thus, for each of the 40 epochs, the closer Gaussian distribution was calculated by using the least squares method, and the TPF value was assigned to the mean of the Gaussian distribution. Then, the average TPF value for the 40 epochs considered was calculated for each sample of mice (n = 6 M3–/– and M3+/+; 5 M2/M4–/– and M2/M4+/+) and vigilance state (PS during the LP and DP; W during the LP and DP). To determine whether the mean TPF values were distinct in KO and WT mice, we calculated the recovery area of the two mean distributions. The TPF values were then considered as distinct spectral rays when the recovery area was inferior to 30% (spectral separation defined at –3 dB), as previously established [22]. Finally, the cumulative theta power (sum of the frequency amplitude between 4–9 Hz) was calculated for W and PS as described previously [19]. To normalize the data, the density of each frequency band activity was averaged and assigned as a relative percentage of total power density (from 0.8 to 47,6 Hz). Statistical significance for the cumulative theta power was assessed by ANOVA with repeated measure and post hoc Student's t test ($p < 0.05$ as a level of significance).

Table 1. Daily quantities, proportion of the total time, number and duration of episodes of PS, W and SWS in M3–/– and M2/M4–/– mice compared with their respective WT controls

KO lines	PS				SWS		W	
	quantity min	proportion %	episodes	episode duration, min	quantity min	proportion %	quantity min	proportion %
M3+/+ (n = 6)	88.5 ± 5.8	6.2 ± 0.4	103.5 ± 8.2	0.86 ± 0.03	555.5 ± 17.9	38.6 ± 1.2	766.7 ± 17.3	53.2 ± 1.2
M3–/– (n = 6)	68.8 ± 6.1*	4.8 ± 0.4*	75.5 ± 6.1*	0.93 ± 0.09	551.8 ± 29.9	38.3 ± 2.1	796.2 ± 32.7	55.3 ± 2.3
M2/M4+/+ (n = 6)	77.2 ± 7.5	5.4 ± 0.5	71.5 ± 8.7	1.08 ± 0.05	527.7 ± 34.3	36.7 ± 2.4	809.6 ± 38.3	56.3 ± 2.7
M2/M4–/– (n = 6)	77.8 ± 10.3	5.4 ± 0.7	81.3 ± 10.1	0.97 ± 0.04	488.0 ± 34.2	33.9 ± 2.4	847.5 ± 43.0	58.9 ± 3.0

Epochs with artifact (about 1.5% of the 24-hour recording) in the EEG were omitted from quantification of the behavioral states. Data are expressed as mean ± SEM for the 24-hour recording period. * $p < 0.05$, significantly different groups, Student's t test.

Results

M3–/– vs. M3+/+ Mice

All M3–/– and M3+/+ mice (n = 6 for each) exhibited a clear-cut diurnal sleep-waking rhythm, with larger amounts of sleep (PS + SWS) during the LP than the DP. Indeed, WT and KO mice spend ≈ 58% of the time asleep during the LP compared with ≈ 30% in the DP (table 1).

However, an in-depth analysis evidenced that M3–/– mice differed significantly from their WT controls by a lower daily amount of PS (–22.3% compared with WT; $F = 5.471$, $p = 0.0414$), at the expense of W (+3.7% compared with WT, not significant), while SWS amounts remained similar. This was due only to a significant reduction of the number of PS episodes (–27.1%, $F = 7.493$, $p = 0.0209$) since the mean duration of bouts remained unchanged ($F = 0.448$, $p = 0.5182$). When considering the photoperiod, PS decreased during both the LP and DP, but more strongly during the 12 h of the DP (LP, –20.3%, $F = 2.875$, $p = 0.1261$; DP, –26.9%, $F = 4.608$, $p = 0.0574$) (fig. 1a). As for PS amounts, the number of PS episodes was reduced during both photoperiods (fig. 1a), but reached significance only during the DP (–28.3%; $F = 6.004$, $p = 0.0342$; LP, –25.9%; $F = 3{,}127$, $p = 0.1074$; fig. 1b). As illustrated in figure 1c, the analysis by 2-hour periods revealed that the major difference between the two groups was a deficit of PS at the period preceding the light off (3:00–5:00 p.m.) in mutant mice ($F = 7.024$, $p = 0.0243$).

Regarding the two other states of vigilance, no significant differences in the standard parameters measured for W and SWS were found between the two groups of mice when analyzed over 24 h, the LP and DP, or 2-hour periods throughout the 24-hour cycle (not shown).

The FFT analysis showed that the PS-TPF values in M3–/– vs. M3+/+ mice were spectrally distinct during the DP, with a frequency increase in mutants (6.73 ± 0.41 vs. 5,98 ± 0.34 Hz, respectively, recovery area <30%; fig. 2a). Finally, no variation in the cumulative theta power was observed for W and PS during both photoperiods between M3–/– and M3+/+ mice.

M2/M4–/– vs. M2/M4+/+ Mice

All M2/M4–/– and M2/M4+/+ mice (n = 6 for each) exhibited a clear-cut diurnal sleep-waking rhythm since they spend ≈ 50% of the time asleep during the LP compared with ≈ 30% in the DP (table 1). No significant differences were found between the two groups in any of the standard parameters regarding the vigilance states, including PS, as measured during 24 h, the LP and DP, and 2-hour periods throughout the 24-hour recordings (fig. 1d–f).

The FFT analysis showed that the PS-TPF values in M2/M4–/– vs. M2/M4+/+ mice were spectrally distinct during both photoperiods with a frequency increase in mutants (6.8 ± 0.60 vs. 6.0 ± 0.35 Hz, recovery area <30% for the LP; 6.95 ± 0.50 vs. 6.23 ± 0.37 Hz, recovery area <30% for the DP) (fig. 2b, c). Finally, the cumulative theta power was significantly decreased during the LP for PS in transgenic vs. control mice (–7.4% of the total EEG power, $p = 0.0492$).

Discussion

Here we showed that PS was depressed in mice lacking functional M_3 muscarinic receptors but not in mice lacking both M_2 and M_4 receptors. Furthermore, M3–/– and

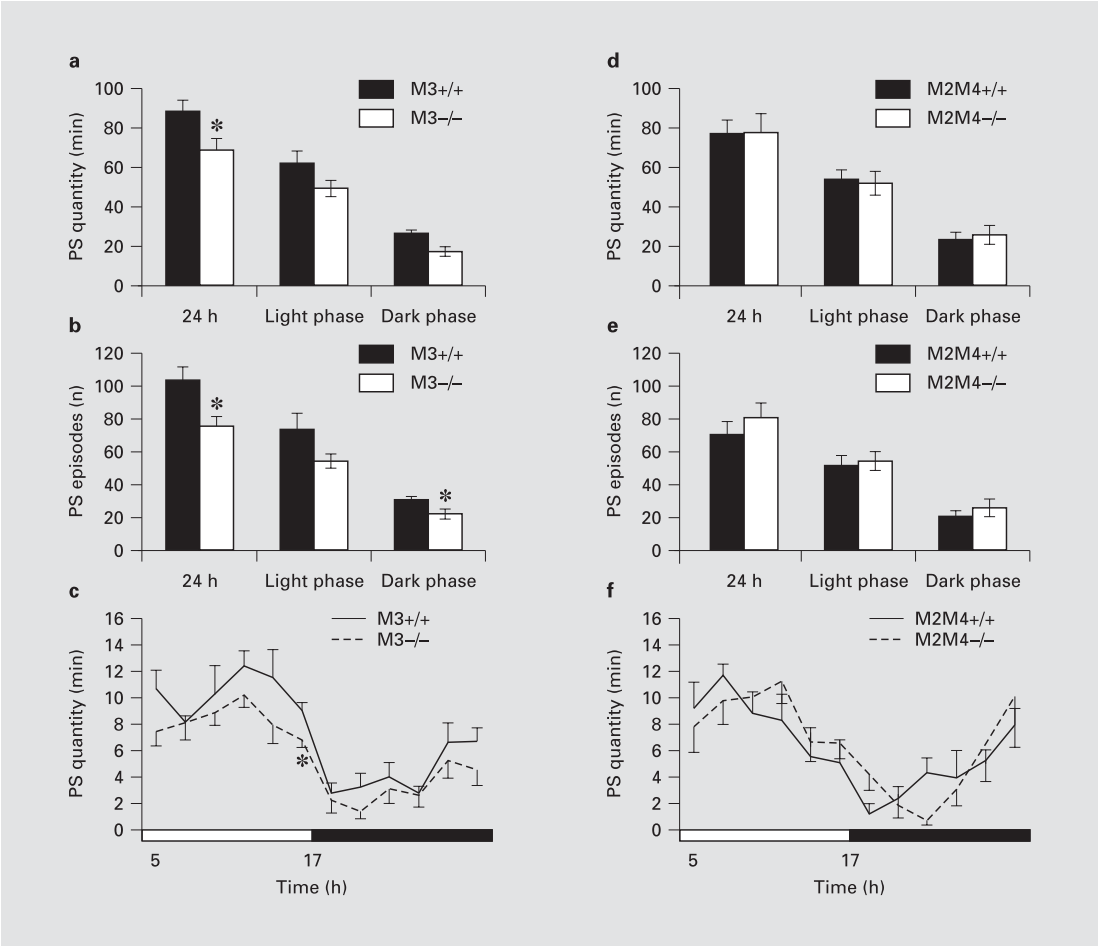


Fig. 1. Comparison of the circadian rhythm of PS (distribution) in M3–/– vs. M3+/+ mice and M2/M4–/– vs. M2/M4+/+ mice. Histograms comparing the mean (± SEM) quantities of PS (**a**, **d**) and PS episodes (**b**, **e**) in KO vs. their respective WT controls over 24 h or the LP and DP (lights on at 5:00 a.m.). **c**, **f** Circadian variations of PS during 12-hour light/dark cycle in KO vs. their respective WT controls. Data are expressed as minutes per 2-hour period (mean ± SEM). * $p < 0.05$, significantly different; Student's t test.

M2/M4–/– mice showed a similar alteration of the theta EEG activity during PS, with a substantial acceleration of its peak frequency. Taken together, these findings suggest that M_3 rather than M_2 or M_4 muscarinic receptors would contribute to the regulation of PS, while multiple muscarinic receptors would be collectively involved in mechanisms underlying the theta EEG activity during PS.

The genetic backgrounds of the two mutant mouse lines were clearly different [17, 18]. Therefore, it is not relevant to directly compare data regarding their sleep-waking cycle. However, all KO mice and their respective WT controls still exhibited a normal sleep-waking cycle with predominance of W during the DP and sleep during the LP, as usually reported in this species. Of particular importance, mean daily PS quantities in M3+/+ and M2/M4+/+ mice were within a normal range, as compared to either M2+/+ or M4+/+ mice we also recorded [16] or the commonly studied mouse strains, including those used for the generation of the mutant lines [19, 23, 24]. Finally, all groups of KO and WT mice, while likely containing a relatively small number of animals (n = 6), were homogenous regarding the different sleep parameters studied, as supported by the weak SEM values calculated with such experimental samples (table 1). Taken together, these data suggest that the PS phenotype in M3–/– would

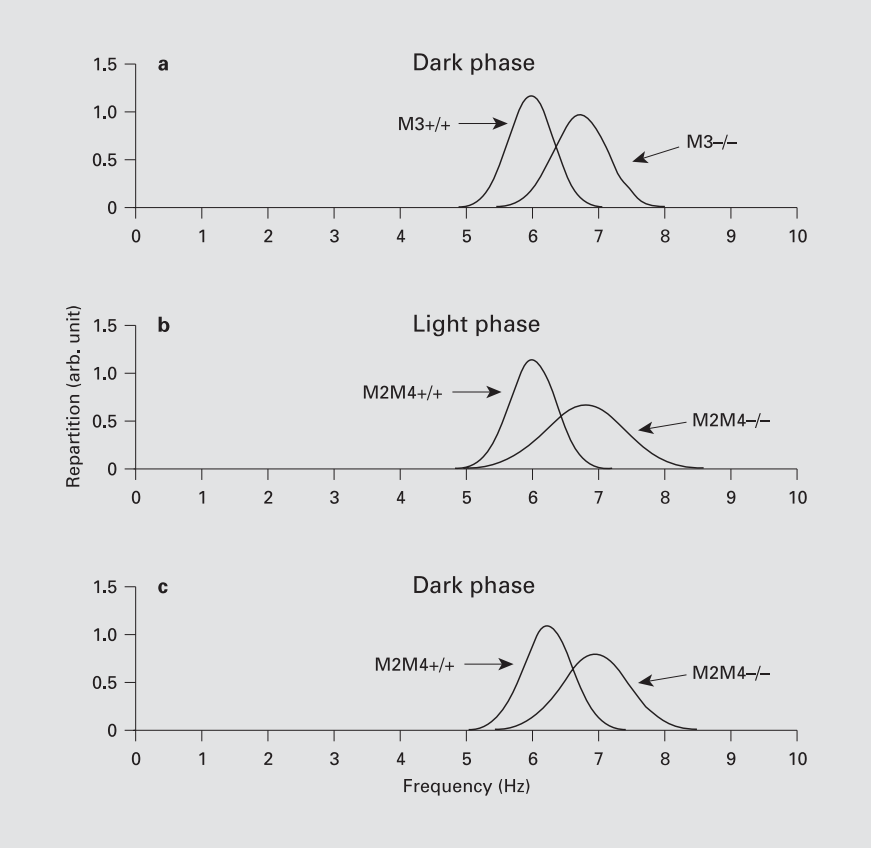


Fig. 2. a Comparison of the normalized distributions of the theta EEG activity for PS in M3–/– compared with M3+/+ during the DP. **b**, **c** Comparison of the normalized distributions of the theta EEG activity for PS in M2/M4–/– vs. M2/M4+/+ mice during the LP and DP. Note that in all cases the TPF during PS was increased in KO mice compared with their WT controls.

be linked to the gene disruption rather than to the mixed genetic background of the mice [25]. Compared with their WT controls, M3–/– mice also displayed a significant reduction in food intake, body weight and peripheral fat deposits but were of normal length, indicating that the lack of M_3 receptors did not lead to a generalized growth retardation [17]. This phenotype is not present in mice deleted for other muscarinic receptors [15, 16]. Since energy balance, food intake and sleep homeostasis are physiological functions centrally coregulated by intricate hypothalamic networks [17], our data do not rule out the possibility that alterations of PS could occur as a secondary phenotype of the M3–/– strain. However, we recently demonstrated in rats that the melanin-concentrating hormone (MCH), an appetite-stimulating peptide synthesized almost exclusively in neurons of the lateral hypothalamus, has powerful hypnogenic potencies and participates in PS regulation [26, 27]. Further, MCH-containing neurons express M_3 receptors, and muscarinic stimulation increases hypothalamic MCH expression that is greatly reduced in M3–/– mice [17]. It is therefore an intriguing possibility that the decrease of PS in these mutant mice might be linked to the dysfacilitation of the MCH system.

While further experiments are necessary to address this question, it remains that PS was significantly decreased in M3–/– vs. M3+/+ mice. Mice lacking both M_2/M_4 muscarinic receptors did not show any perturbation of their sleep-waking cycle, as also reported for mice deleted selectively for M_2 or M_4 muscarinic receptors [16]. Our data, supporting the involvement in PS of M_3 rather than M_2 and M_4 muscarinic receptors, are difficult to reconcile with pharmacological results recently reported in the same species and that support the contribution of M_2 receptors [12]. However, as stated by the authors, a major limitation of the in vivo pharmacological approach is the limited selectivity for M_2 receptors of drugs infused by microdialysis [13]. In addition, they did not test the effects on PS of antagonists or agonists for other subtypes of muscarinic receptors, such as M_3 receptors. Furthermore, anatomical studies demonstrate that disruption of a specific muscarinic receptor gene does not modify the

expression levels of, at least, the other muscarinic receptor subtypes [15, 17, 28, 29]. For example, the lack of M_2 receptors does not lead to the overexpression in the brainstem of M_4 receptors that share pharmacological and functional properties with M_2 receptors [13, 28]. It is therefore unlikely that the PS phenotype present in M3–/– and absent in M2/M4–/– mice could only be due to compensatory mechanisms during development regarding muscarinic receptor expression. Our present data suggest therefore that acetylcholine, via activation of M_3 muscarinic receptors, contributes to the modulation of PS but does not gate its spontaneous generation in mice. To clearly address this question, it would be useful to study in M3–/– mice the homeostatic regulation of PS following total sleep or selective PS deprivation.

In this study, we found that theta EEG activity is unusually regulated when M_3 or both M_2/M_4 muscarinic receptors are lacking. Since M2–/– and M4–/– mice displayed no evident perturbation [16], the presence of either of these two receptor subtypes is sufficient for normal theta EEG activity. However, the individual M_2, M_3 and M_4 receptors are not essential for the generation of theta activity but contribute to the modulation of both its frequency and power density. It is therefore likely that the alteration of theta EEG activity reflects perturbations induced by unbalanced muscarinic transmission within the complex neuronal network responsible for its generation and regulation regarding the vigilance states.

Conclusion

This investigation has led to new insights into the roles of the individual muscarinic receptor subtypes in the regulation of PS, particularly regarding M_3 muscarinic receptors. It would be of particular interest to study their possible involvement in the homeostatic mechanisms of PS regulation.

Acknowledgement

Romain Goutagny received a PhD grant from the Région Rhône-Alpes.

References

1 Jouvet M: Neurophysiology of the states of sleep. Physiol Rev 1967;47:117–177.

2 Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M: Mapping of cholinoceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. Arch Ital Biol 1989;127:133–164.

3 Baghdoyan HA, Lydic R, Callaway CW, Hobson JA: The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine. Neuropsychopharmacology 1989;2:67–79.

4 Sakai K, Onoe H: Critical role for M3 muscarinic receptors in paradoxical sleep generation in the cat. Eur J Neurosci 1997;9:415–423.

5 Velazquez-Moctezuma J, Gillin JC, Shiromani PJ: Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. Brain Res 1989;503:128–131.

6 Baghdoyan HA, Lydic R: M2 muscarinic receptor subtype in the feline medial pontine reticular formation modulates the amount of rapid eye movement sleep. Sleep 1999;22:835–847.

7 Gnadt JW, Pegram GV: Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. Brain Res 1986;384:29–41.

8 Bourgin P, Escourrou P, Gaultier C, Adrien J: Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat. Neuroreport 1995;6:532–536.

9 Deurveilher S, Hars B, Hennevin E: Pontine microinjection of carbachol does not reliably enhance paradoxical sleep in rats. Sleep 1997;20:593–607.

10 Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH: The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. Eur J Neurosci 2002;16:1959–1973.

11 Baghdoyan HA: Location and quantification of muscarinic receptor subtypes in rat pons: implications for REM sleep generation. Am J Physiol 1997;273:R896–R904.

12 Coleman CG, Lydic R, Baghdoyan HA: M2 muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. Neuroscience 2004;126:821–830.

13 Caulfield MP, Birdsall NJ: International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. Pharmacol Rev 1998;50:279–290.

14 Lydic R, Douglas CL, Baghdoyan HA: Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of C57BL/6J mouse enhances rapid eye movement sleep and depresses breathing. Sleep 2002;25:835–841.

15 Wess J: Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. Trends Pharmacol Sci 2003;24:414–420.

16 Goutagny R, Fort P, Salvert D, Boissard R, Gomeza J, Wess J, et al: Sleep-waking cycle and EEG rhythmic activities in mice lacking M2, M3, M4 or M2/M4 muscarinic receptors. Sleep 2003;26(suppl):67.

17 Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, et al: Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. Nature 2001;410:207–212.

18 Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, et al: Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. Mol Pharmacol 2002;62:1084–1093.

19 Franken P, Malafosse A, Tafti M: Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. Am J Physiol 1998;275:R1127–1137.

20 Beuckmann CT, Sinton CM, Miyamoto N, Ino M, Yanagisawa M: N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. J Neurosci 2003;23:6793–6797.

21 Parmentier R, Ohtsu H, Djebbara-Hannas Z, Valatx JL, Watanabe T, Lin JS: Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. J Neurosci 2002;22:7695–7711.
22 Bruat G: Optique, ed 5. Paris, Masson & Cie, 1965.
23 Kitahama K, Valatx JL: Instrumental and pharmacological paradoxical sleep deprivation in mice: strain differences. Neuropharmacology 1980;19:529–535.
24 Valatx JL, Bugat R: Genetic factors as determinants of the waking-sleep cycle in the mouse (in French). Brain Res 1974;69:315–330.
25 Gerlai R: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? Trends Neurosci 1996;19:177–181.
26 Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, et al: A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci 2003;4:19.
27 Goutagny R, Verret L, Fort P, Salvert D, Leger L, Luppi PH, et al: Posterior hypothalamus and regulation of vigilance states. Arch Ital Biol 2004;142:487–500.
28 Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodkin J, et al: Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M_4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:10483–10488.
29 Gomeza J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodkin J, et al: Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:1692–1697.

Le sommeil chez les souris M_2-/- et M_4-/-

L'analyse des données polysomnographiques chez les souris invalidées pour les récepteurs M_2 et M_4 ne montre pas de modifications des quantités de sommeil comparées à leurs témoins respectifs (figure 38) :

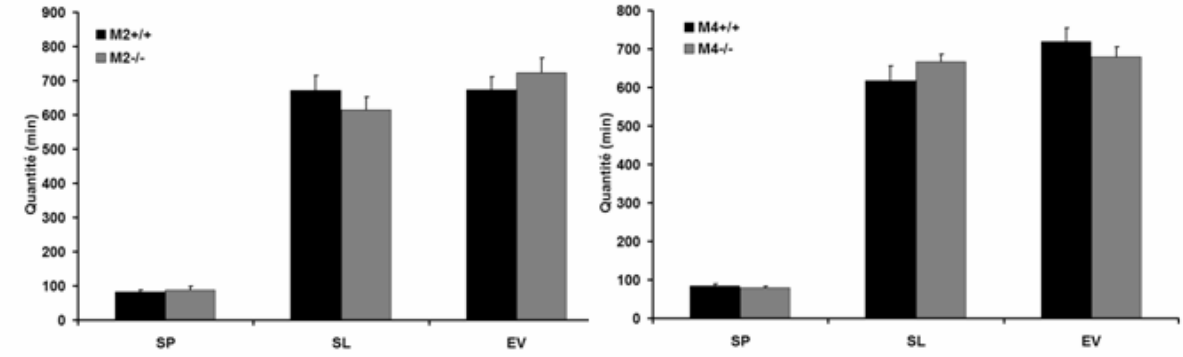


Figure 38 : Quantités des différents états de vigilance (en min/24h) chez les souris M_2+/+, M_2-/-, M_4+/+ et M_4-/-.

Plus spécifiquement, aucun des paramètres classiquement utilisés pour l'analyse des états de vigilance ne présente de modifications significatives:

Lignées	Sommeil Paradoxal				Sommeil lent		Eveil	
	Durée (min)	Proportion (%)	Nombre d'épisodes	Durée des épisodes (min)	Quantité (min)	Proportion (%)	Quantité (min)	Proportion (%)
M2+/+ (n=4)	81,9±5.3	5.7±0.37	85.5±9.9	0.98±0.07	671.3±42.6	46.7±3	672.5±37.9	46.8±2.6
M2-/- (n=4)	87.5±10	6.1±0.7	81.8±12.2	1.13±0.05	614.9±36	42.8±2.5	723.6±41.6	50.3±2.9
M4+/+ (n=4)	84.9±4	5.9±0.3	93±8.3	0.93±0.05	618±37	43±2.6	719±34.8	50±2.4
M4-/- (n=4)	79.1±4	5.5±0.3	79.8±5	0.99±0.8	666.1±20.3	46.3±1.4	679.1±25.2	47.2±1.8

Tableau 2 : Quantités journalières, pourcentage du temps total, nombre et durées des épisodes de SP, SL et EV chez les souris M2-/- et M4-/- comparées à leurs témoins respectifs.

De plus, nous n'observons pas de différences significatives dans la régulation circadienne du SP (figure 39) entre les témoins et les souches mutantes:

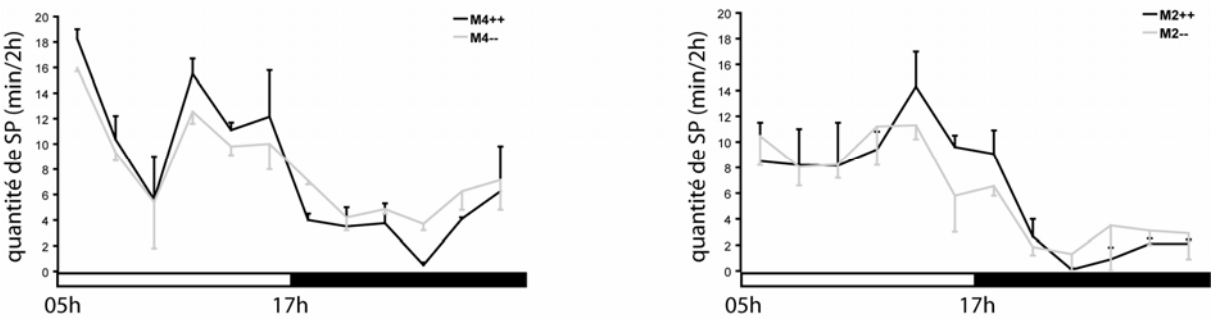


Figure 39 : Distribution par tranches de 2 heures des quantités de SP chez les souris M_2+/+, M_2-/-, M_4+/+ et M_4-/-.

L'analyse spectrale de l'EEG durant l'EV et le SP n'a pas non plus permis de mettre en évidence de différences significatives entre les souris KO et leurs témoins respectifs (figure 40):

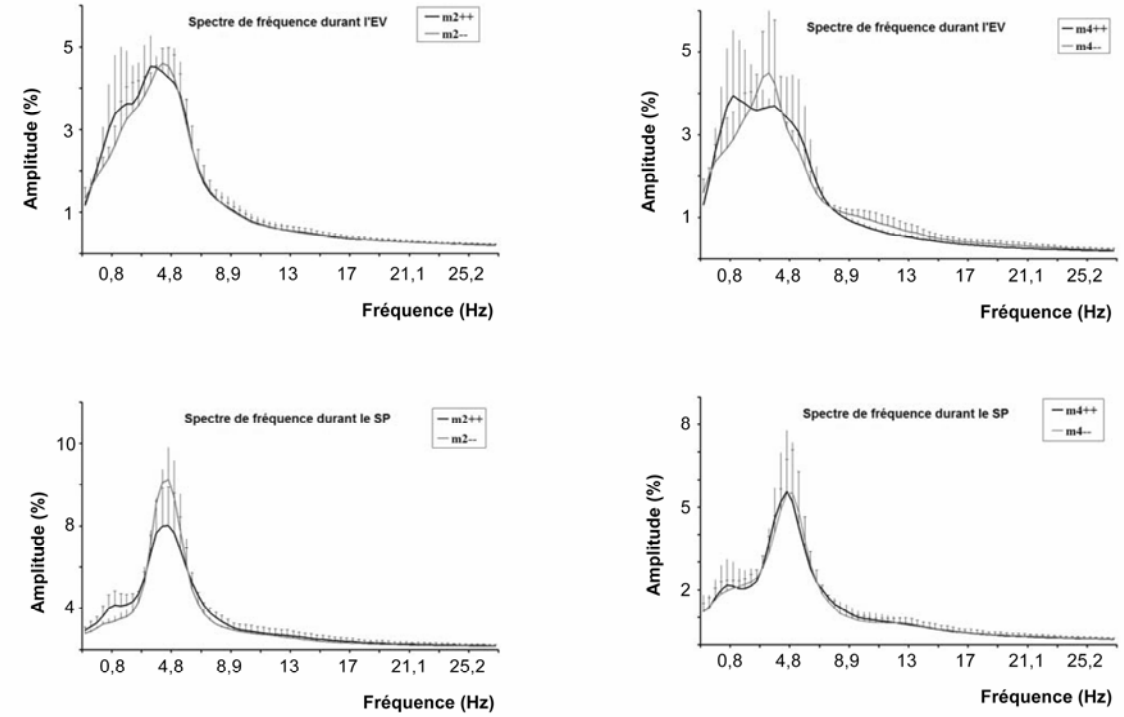


Figure 40 : Comparaison des spectres de fréquences relatifs durant l'EV et le SP des souris M2-/- et M4-/- comparées à leurs contrôles respectifs.

Plus précisément, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives concernant la fréquence moyenne du pic de thêta ou son amplitude relative chez les souris M2-/- et M4-/- comparées à leurs témoins respectifs :

Lignées	Fréquence du pic de thêta (Hz)		Amplitude relative du thêta (%)	
	EV	SP	EV	SP
M2+/+ (n=4)	6.15±0.44	6.75±0.21	46.3±1.5	55.5±4.1
M2-/- (n=4)	6.53±0.3	6.72±0.13	48.2±1.3	61.5±3.3
M4+/+ (n=4)	7.1±0.3	7.3±0.2	42±4.3	48.7±6.6
M4-/- (n=4)	6.5±0.2	6.8±0.2	37±0.8	45.8±2.7

Tableau 3 : Fréquence moyenne du pic et amplitude relative du thêta chez les souris M2-/- et M4-/- durant l'EV et le SP comparées à leurs témoins respectifs.

Discussion et conclusion

Nos données mettent en évidence une diminution des quantités de SP chez les souris invalidées pour les récepteurs M3, mais pas chez les souris KO pour les récepteurs M2, M4 ou doublement invalidées pour les récepteurs M2 et M4.

Ces résultats suggèrent donc que les récepteurs M3, plutôt que les récepteurs M2 et/ou M4 seraient impliqués dans la régulation physiologique du SP.

Cependant, il est important de noter que le SP est toujours présent chez les souris M3-/-, suggérant que l'acétylcholine, via l'activation de récepteurs de type M3, serait impliquée plutôt dans la modulation que dans l'initiation du SP.

Ces résultats sont ainsi en accord avec les études récentes, indiquant que la genèse du SP chez le rongeur (rat et souris) serait préférablement médiée par le GABA et non par l'acétylcholine (Boissard et coll., 2002; Boissard et coll., 2003 ; Pal et Mallick 2004; Vazquez et Baghdoyan 2004; Verret et coll., 2005). En effet, l'injection de bicuculline, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ au sein du noyau sub-latéro dorsal (l'équivalent chez le rat du péri-LCα), induit un état proche du SP (nommé SP-like par les auteurs) alors que l'injection de carbachol dans cette même région induit un EV actif (Boissard et coll., 2002).

Pour autant, les mécanismes de genèse du SP ne sont pas si différents entre le chat et le rat. Le GABA joue également un rôle prépondérant chez le chat. Il a en effet été montré que l'injection dans le tegmentum pontique de bicuculline induit une forte hypersomnie en SP (+203% par rapport à une injection témoin de NaCl) et ce, au détriment de l'EV (Xi et coll. 1999).

Chez le chat, et contrairement au rat, le GABA et l'ACh seraient impliqués dans l'initiation du SP. Il existerait ainsi une interaction entre les systèmes cholinergiques et GABAergiques du tegmentum pontique dorsal.

La principale différence entre le chat et le rat serait la nature cholinoceptive des neurones exécutifs du SP. Néanmoins, le GABA semble être le neurotransmetteur principal impliqué dans l'initiation et le maintien du SP.

Les données obtenues au cours de cette étude démontrent cependant que l'ACh, via l'activation des récepteurs M3 pourrait être impliquée dans la régulation homéostatique du SP. L'étude, chez les souris M3-/- des rebonds de SP suite à des privations totales de sommeil ou sélectives de SP permettraient de tester plus précisement cette hypothèse.

De plus, une étude récente étudiant le sommeil de souris invalidées pour les récepteurs nicotiniques α4 met en évidence une augmentation du nombre de micro-éveils au cours des épisodes de SL chez ces souris sans modifications des quantités des différents états de vigilance (Fonck et coll. 2005). Ces résultats indiquent donc que l'ACh, via l'activation de récepteurs nicotinique, pourrait participer à la consolidation du SL (Lena et coll. 2004; Fonck et coll., 2005).
Ainsi, l'ACh, via l'activation de recepteurs muscariniques et nicotiniques pourrait être impliqué non pas dans l'initiation mais dans la régulation du SP et du SL.

Une autre donnée importante de notre étude concerne la modification de l'activité thêta observée durant le SP chez les souris M3-/- et M2M4-/-. Etant donné l'absence de modifications observées chez les souris M2-/- et M4-/-, il apparaît que la présence d'un seul de ces récepteurs est suffisante pour une régulation normale de l'activité thêta.
Cependant, nous observons toujours un rythme thêta chez les souris KO enregistrées dans notre étude, que ce soit au cours de l'EV ou au cours du SP. Ainsi, les récepteurs M2, M3 et M4 ne paraissent pas indispensables à la génération de l'activité thêta, mais semblent plutôt participer à la modulation de sa fréquence et de son amplitude.
Il est intéressant de noter que nous observons des modifications de l'activité thêta uniquement durant le SP. Or, l'activité thêta du SP serait le support des phénomènes de consolidations mnésiques intervenant durant cet état de vigilance (Louie et Wilson 2001; Hobson et Pace-Schott 2002; Ribeiro et Nicolelis 2004). Ces phénomènes de consolidations seraient de plus fortement dépendants de la fréquence du rythme thêta (Booth et Poe 2006). Ainsi, les modifications du rythme thêta observées au cours de notre étude pourraient etre à l'origine de déficit cognitifs chez les souris M3-/- et M2M4-/-. Cette hypothèse a été partiellement confirmée pour les souris M2M4-/-, qui montrent une altération de leurs performances au test d'évitement passif (Tzavara et coll. 2003). L'étude des performances des souris M3-/- en réponse à différents tests d'apprentissage dépendants de l'hippocampe permettrait de confirmer cette hypothèse.

Nos données mettent donc en évidence des modifications des quantités de SP et du rythme thêta lorsque la transmission muscarinique est perturbée. L'une des caractéristiques des souris KO est que l'expression du gène d'intérêt est altérée au niveau de l'organisme entier, et non au niveau d'une structure particulière. Or, étant donné la répartition quasiment ubiquitaire des

récepteurs muscariniques au sein du cerveau (Cf Matériel et méthode), il n'est pas possible d'attribuer les modifications observées à une population neuronale donnée.

En conclusion, l'ACh, via l'activation des récepteurs muscariniques, semble impliquée dans la modulation plutôt que dans la genèse, aussi bien du SP que du rythme thêta chez la souris.

Ainsi, l'initiation du SP chez le rongeur (rat et souris) serait due préférentiellement à des neurones GABAergiques et non cholinergiques

Chapitre 2 :

Rôle des neurones de l'hypothalamus postérieur dans la régulation du sommeil paradoxal

Introduction

Il a été démontré que le SP est toujours présent chez un chat dont les structures rostrales au pont ont été supprimées (Jouvet 1962). Ces travaux démontrent que les structures suffisantes à la genèse et au maintien du SP se trouvent dans le tronc cérébral. C'est pourquoi le rôle de l'hypothalamus dans la régulation du SP a depuis été largement négligé et ceci malgré les données expérimentales soulignant l'implication de cette région. En effet, outre la fonction démontrée dans le maintien de l'éveil des neurones à histamine et à hypocrétines de l'hypothalamus postérieur, l'existence de neurones actifs spécifiquement pendant le SP dans ces structures (Steininger et coll., 1999; Alam et coll., 2002; Koyama et coll., 2003) indiquent un rôle potentiel de certaines populations hypothalamiques dans la régulation de cet état de vigilance.

Afin de déterminer l'implication des neurones de l'hypothalamus postérieur dans l'homéostasie du SP, nous avons choisi de combiner l'immunohistochimie du marqueur fonctionnel, Fos, de la MCH et des Hcrt chez des rats privés de SP, des rats pouvant effectuer un rebond de SP après sa privation spécifique, et des rats témoins. Afin de déterminer si le peptide MCH pouvait agir directement sur la régulation du SP, nous avons également étudié l'effet d'injections intracérébroventriculaires de MCH sur le cycle veille-sommeil chez le rat.

Ce travail fait l'objet d'un article publié dans *BMC Neurosciences*.

BMC Neuroscience

Research article

Open Access

A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep

Laure Verret†, Romain Goutagny†, Patrice Fort, Laurène Cagnon, Denise Salvert, Lucienne Léger, Romuald Boissard, Paul Salin, Christelle Peyron and Pierre-Hervé Luppi*

Address: CNRS UMR5167, Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon (IFR 19), Université Claude Bernard Lyon I, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, FRANCE

Email: Laure Verret - verret@sommeil.univ-lyon1.fr; Romain Goutagny - goutagny@sommeil.univ-lyon1.fr; Patrice Fort - fort@sommeil.univ-lyon1.fr; Laurène Cagnon - cagnon@sommeil.univ-lyon1.fr; Denise Salvert - salvert@sommeil.univ-lyon1.fr; Lucienne Léger - leger@sommeil.univ-lyon1.fr; Romuald Boissard - boissard@sommeil.univ-lyon1.fr; Paul Salin - paul.salin@sommeil.univ-lyon1.fr; Christelle Peyron - peyron@sommeil.univ-lyon1.fr; Pierre-Hervé Luppi* - luppi@sommeil.univ-lyon1.fr

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 09 September 2003

BMC Neuroscience 2003, **4**:19

Received: 17 July 2003
Accepted: 09 September 2003

This article is available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2202/4/19

© 2003 Verret et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

Abstract

Background: Peptidergic neurons containing the melanin-concentrating hormone (MCH) and the hypocretins (or orexins) are intermingled in the zona incerta, perifornical nucleus and lateral hypothalamic area. Both types of neurons have been implicated in the integrated regulation of energy homeostasis and body weight. Hypocretin neurons have also been involved in sleep-wake regulation and narcolepsy. We therefore sought to determine whether hypocretin and MCH neurons express Fos in association with enhanced paradoxical sleep (PS or REM sleep) during the rebound following PS deprivation. Next, we compared the effect of MCH and NaCl intracerebroventricular (ICV) administrations on sleep stage quantities to further determine whether MCH neurons play an active role in PS regulation.

Results: Here we show that the MCH but not the hypocretin neurons are strongly active during PS, evidenced through combined hypocretin, MCH, and Fos immunostainings in three groups of rats (PS Control, PS Deprived and PS Recovery rats). Further, we show that ICV administration of MCH induces a dose-dependant increase in PS (up to 200%) and slow wave sleep (up to 70%) quantities.

Conclusion: These results indicate that MCH is a powerful hypnogenic factor. MCH neurons might play a key role in the state of PS via their widespread projections in the central nervous system.

Background

In the middle of the last century, a series of historical observations lead to the discovery of a sleep phase in humans and other mammals paradoxically characterized by cortical activation and rapid eye movements, and associated with a complete disappearance of the muscle tone [1–3]. This phase of sleep, coined paradoxical sleep (PS) or rapid eye movement (REM) sleep was then demonstrated to correlate with dream activity [3,4]. It was soon reported by Jouvet [5] that the state of PS is still present in

"pontine cats" in which all structures rostral to the brainstem have been removed. This seminal experiment demonstrated that the brainstem contains the structures responsible for the generation of PS. Following this clear-cut demonstration, the potential role of the forebrain has therefore been poorly studied. However, a few studies suggest that the posterior hypothalamus might play a role in PS homeostasis. It has been shown that reversible inactivation of the lateral hypothalamic area by muscimol (a GABAa agonist) applications induces a disappearance of PS [6]. In addition, neurons specifically active during PS have been recorded in the same area [7,8]. Finally, it has recently been shown that narcolepsy, a sleep disorder characterized by excessive daytime sleepiness and cataplexy, is due to the lack of hypocretin mRNA and peptides in Humans [9] or a disruption of the hypocretin receptor 2 or its ligand in dogs and mice [10,11]. Interestingly, hypocretin neurons are localized exclusively in the dorsomedial, lateral and perifornical hypothalamic areas [12]. Neurons containing another peptide, melanin-concentrating hormone (MCH), co-distributed with hypocretin neurons could also play a role in PS control. Indeed, like the hypocretin neurons, they send strong projections to brainstem structures responsible for the onset and maintenance of PS [12–14]. Moreover, abundant putative contacts between both types of neurons have been observed, suggesting that both populations may interact at the hypothalamic level [15]. To determine whether the neurons from the lateral hypothalamic area and the perifornical nucleus and more specifically those containing hypocretin and MCH are indeed implicated in PS homeostasis, we combined Fos, hypocretin and MCH immunohistochemistry in rats deprived of PS, with enhanced PS during rebound after PS deprivation and in control condition. We chose this method because the examination of Fos, the product of the immediate early gene *cfos* that is expressed in association with neuronal discharge and entry of Na+ and Ca^{2+} ions, is now well-accepted to study neuronal activity [16,17]. In addition, it has been recently and successfully used to localize and characterize the chemical identity of the brainstem neurons responsible for PS generation [18–20].

Using this method, we found that the large majority of MCH, but not hypocretin neurons are immunoreactive to Fos specifically after PS hypersomnia. To further determine whether MCH play a direct role in PS regulation, we designed a second series of experiments in which we compared the effect on the sleep-waking cycle of ICV injection of different doses of MCH with that of NaCl injections.

Results

Sleep recording data

The PS deprivation procedure was effective in producing a near complete elimination of PS in the group of rats perfused after the 72 h of deprivation (PSD group) and also in that subjected to the same deprivation and then allowed to recover for three hours before perfusion (PSR group). These two groups of rats presented no significant difference in their quantities of PS (PSD: 4.4 ± 2.5 min, PSR, 4.8 ± 3.0 min), SWS (PSD: 1348.5 ± 80.0 min, PSR, 1375.6 ± 136.6 min) and W (PSD: 2965.9 ± 83.2 min, PSR, 2929.3 ± 129.2 min) during the 72 h of deprivation.

During the 150 min prior to sacrifice, the quantities of PS were significantly different in the PSD and PSR groups and in the group of control animals (PSC group) ($p < 0.05$). The state of PS constituted 16 % of the last 150 minutes prior to sacrifice in the PSC group, 0 % in the PSD group and 44 % in the PSR group (Table 1). There was a significant decrease in the time spent in slow wave sleep (SWS) in PSD (30 %) and PSR (33 %) conditions as compared to the PSC (48 %) condition ($p < 0.05$). The PSD group presented a large quantity of waking (W) (70%) compared to the PSC (36%) and PSR (23%) groups. The increase in PS quantities during the last 150 minutes prior to sacrifice in the PSR group compared to the PSC group was due to a significant increase in the duration of the PS bouts (PSC, 1.2 ± 0.1 min; PSR, 2.5 ± 0.2 min) ($p < 0.001$). The number of bouts did not vary significantly between the two groups (PSC, 21.2 ± 2.3; PSR, 27.2 ± 3.9).

Fos expression in the posterior hypothalamus across vigilance states

The number of Fos+ neurons located in the posterior hypothalamus as a whole was highly significantly increased in the PSR group compared to the PSC and PSD groups (Figs. 1 and 2) (Table 1). The mean number of Fos+ neurons was superior in the PSD group compared to the PSC group but it did not reach statistical significance (Table 1). Across conditions, the number of Fos+ neurons in the posterior hypothalamus was positively correlated with the percent PS ($R = 0.648$, $p < 0.05$) and showed no correlation with the percent wake ($R = 0.337$) or the percent SWS ($R = 0.418$).

The largest number of Fos+ neurons in the PSR group was localized in the lateral hypothalamic area (151.6 ± 12.2 neurons per hemi-section). A substantial number of labeled cells was also observed in the rostral part of the zona incerta (77.0 ± 17.6 neurons per hemi-section), perifornical nucleus (55.7 ± 4.9 neurons per hemi-section), dorsal hypothalamic area (56.2 ± 9.7 neurons per hemi-section) and ventromedial hypothalamic nucleus (50.0 ± 15.7 neurons per hemi-section). A small number of cells was localized in the dorsomedial hypothalamic nucleus (36.7 ± 6.8 neurons per hemi-section) and the caudal part of the zona incerta (22.5 ± 3.6 neurons per hemi-section). In all these structures, excepting the lateral and dorsal hypothalamic areas, the number of Fos+ cells in the PSC

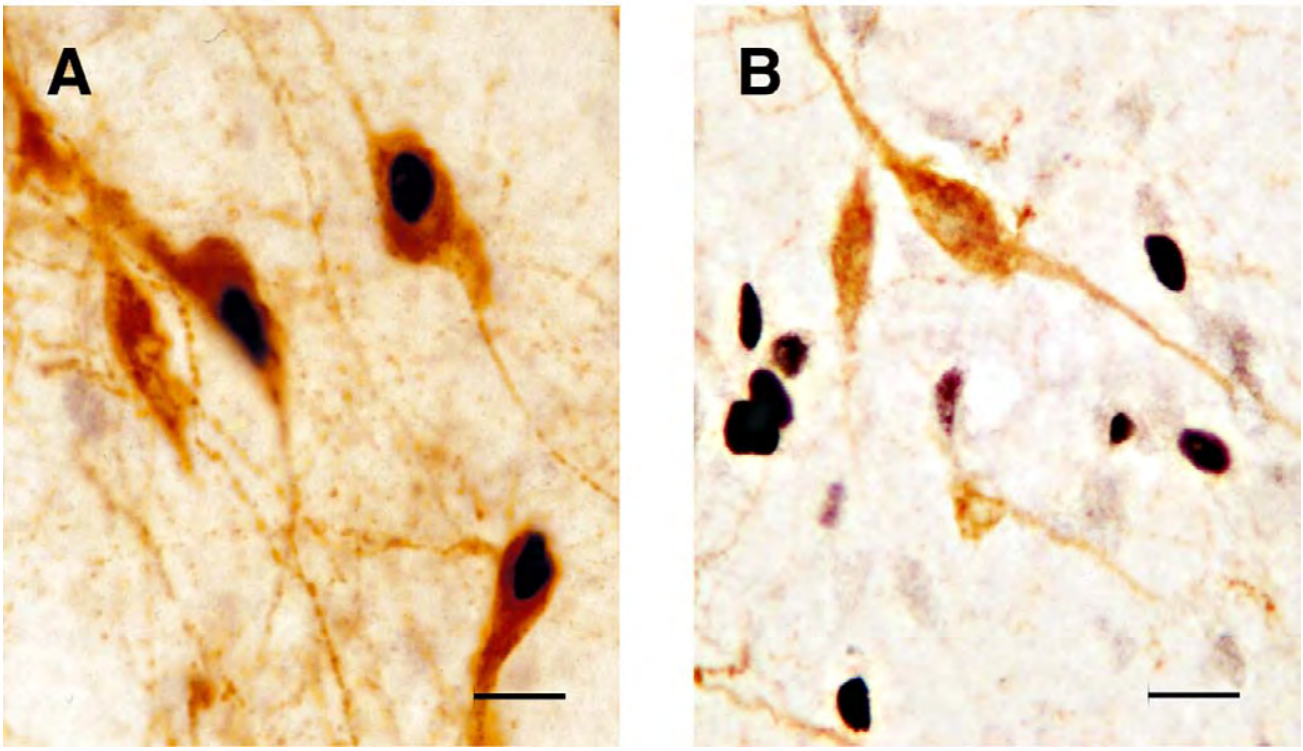


Figure 1
Photomicrographs of double-immunostained sections from a rat belonging to the PS-Recovery condition. A, Three double-labeled MCH+/Fos+ cells with their cytoplasm colored in brown and their nucleus labeled in black and one single labeled MCH+ cell. B, Fos+ (with a black nucleus) and hypocretin (with a brown cytoplasm) single labeled cells. Scale bars: 20 μm.

Table 1: Sleep stages quantities and cell counts for control (PSC), PS deprived (PSD) and PS recovery (PSR) groups.

	PSC	PSD	PSR
W	53.48 ± 3.65	104.55 ± 10.14¶¶¶	34.48 ± 4.80###
SWS	72.08 ± 3.93	45.63 ± 10.16¶	49.40 ± 4.95 *
PS	24.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0¶¶¶	65.8 ± 4.0 ***, ###
Fos+	25.00 ± 11.16	160.42 ± 32.13	445.24 ± 70.11 ***, ##
Hypocretin+	92.25 ± 7.40	113.07 ± 9.06	96.34 ± 3.25
Hypocretin+/Fos+	0.06 ± 0.06	3.31 ± 0.90¶	2.03 ± 0.86
MCH+	201.17 ± 12.18	186.50 ± 12.15	195.00 ± 8.75
MCH+/Fos+	0.13 ± 0.13	0.27 ± 0.11	113.46 ± 4.72 ***, ###

Time spent in W, SWS and PS is reported in minutes, scored per 10 sec epochs over the last 150 minutes of the experiment. The number (mean ± SEM) of Fos+, MCH+, Hypocretin+ and double-labeled neurons (Hypocretin+/Fos+ or MCH+/Fos+) was calculated in the posterior hypothalamus for control (PSC, n = 4), PS deprived (PSD, n = 4) and PS recovery (PSC, n = 4) rats. Cells were counted on 4 and 6 hemi-sections per animal for Hypocretin/Fos and MCH/Fos labelings respectively. Significance values indicated for individual points are: ¶ $p < 0.05$ and ¶¶¶ $p < 0.001$ between PSD and PSC, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ between PSR and PSC, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ betweenPSR and PSD conditions.

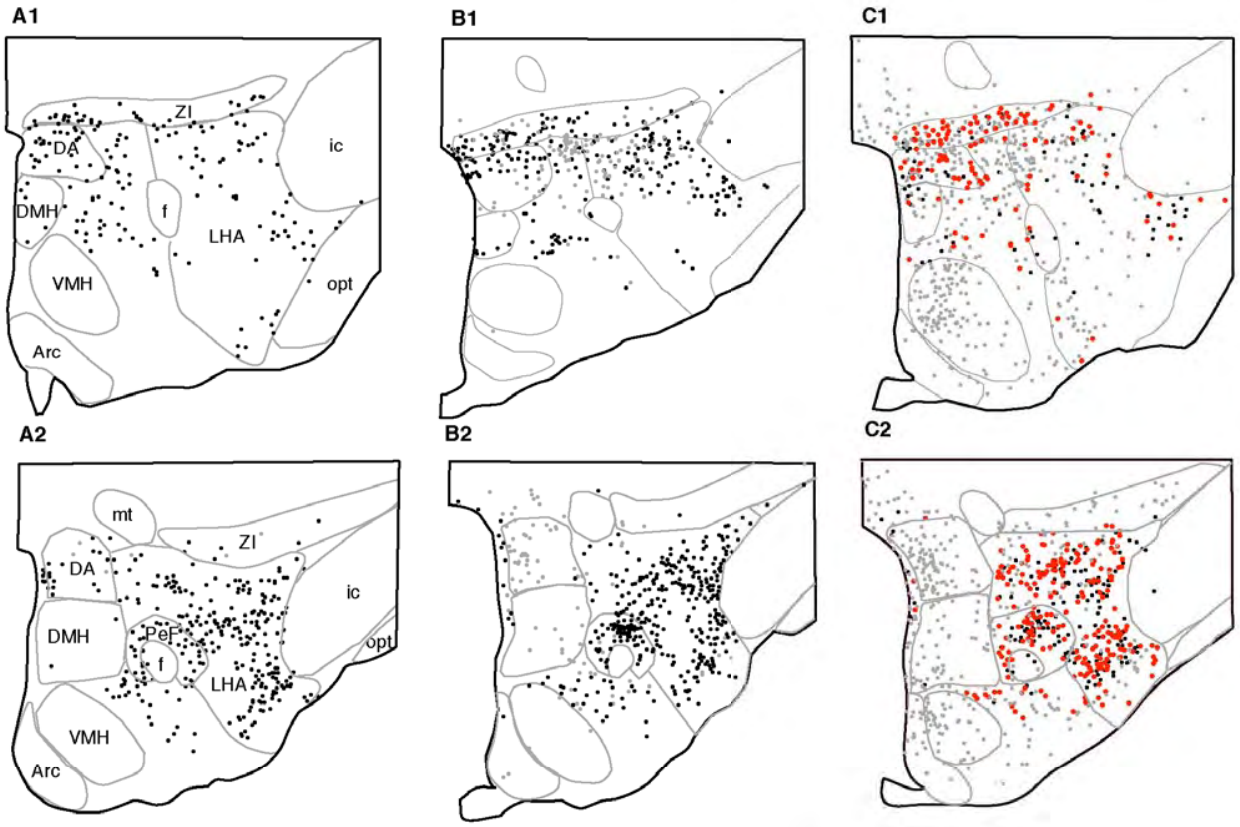


Figure 2
Schematic distribution of Fos+ (grey dots), MCH+ (black dots) and MCH+/Fos+ (red dots) neurons on two coronal hemi-sections of the hypothalamus in a representative animal for PS-Control (A1, A2), PS-Deprivation (B1, B2) and PS-Recovery (C1, C2) conditions. Note the very large number of MCH+/Fos+ cells specifically in the PSR condition. Abbreviations: Arc, arcuate nucleus; DA, dorsal hypothalamic area; DMH, dorso-medial hypothalamic area; f, fornix; ic, internal capsule; LHA, lateral hypothalamic area; mt, mammillothalamic tract; opt, optic tract; PeF, perifornical area; VMH, ventro-medial hypothalamic area; ZI, zona incerta.

and PSD group was very limited and not statistically different between the two groups and significantly inferior to the PSR group. In the lateral and dorsal hypothalamic areas, the number of Fos+ neurons was significantly superior in the PSD group compared to the PSC group ($p < 0.05$) and significantly inferior compared to the PSR group ($P < 0.05$).

In all groups, the arcuate nucleus of the hypothalamus contained only a few Fos+ cells.

Fos expression in hypocretin and MCH neurons across vigilance states

In all groups, only a few to occasional hypocretin neurons expressed Fos (PSR, 2%; PSD, 3%; PSC, 0.1% of all the hypocretin neurons counted) (Fig. 1A) (Table 1). The number of Hypocretin+/Fos+ cells was neither correlated with the percent waking ($R = 0.396$), the percent SWS ($R = -0.455$) nor the percent PS ($R = -0.19$).

In contrast to hypocretin, the majority of the MCH+ cells were immunoreactive to Fos in the recovery condition (Fig. 1B, Fig. 2C) whereas only a few were Fos+ in the deprivation and control conditions (PSR, 58%; PSD, 0.2%; PSC, 0.1% of all the MCH neurons counted) (Fig. 2) (Table 1). Across conditions, the number of MCH+/Fos+ cells was significantly and positively correlated with the percent time spent in PS ($R = 0.917$, $p < 0.0001$) and negatively correlated with the percent waking ($R = -0.65$, $p < 0.05$). It was not significantly correlated with the percent SWS ($R = -0.28$). In the PSR condition, the MCH+/Fos+ neurons made up for 76 % of the Fos+ neurons localized

in the perifornical area, 60% of the Fos+ neurons in the lateral hypothalamic area and 34% of the Fos+ neurons in the rostral zona incerta.

Effect of MCH ICV administrations on the sleep-wake cycle

The injection of 0.02, 0.2, 1 and 5 μg of MCH into the left lateral ventricle of rats at dark onset induced a dose-dependant and significant increase in the amount of PS (Fig. 3, Table 2). Injection of 10 μg of MCH had no significant effect. The strongest increases in PS quantities were obtained with 0.2 and 1 μg MCH doses. The maximum increase with these two doses compared to NaCl was seen during the first two hours (0.2 μg, 198%; 1 μg, 174%) ($p < 0.01$). The increase of PS quantities following 0.2 and 1 μg injections was visible during 8 and 4 h, respectively (Fig. 3, Table 2). The injection of 0.02 μg of MCH induced a smaller increase in PS quantity compared to NaCl with a maximum increase again during the first two hours (137%) ($p < 0.05$). With this dose, PS quantities remained significantly increased only during the first four hours compared to saline. The 5 μg MCH dose significantly increased PS quantities compared to NaCl but only during the third and fourth hours (119%)($p < 0.01$).

For the 0.2, 1 and 5 μg doses, the increase in PS quantities was due to an increase in the number of bouts of PS and not in their duration (Fig. 4). In the case of the 0.02 μg injections, the number of bouts and their duration were not significantly modified. For all doses, the latency of the first PS episode was unchanged compared to NaCl.

In addition to the effect on PS, a significant increase in SWS and a decrease in W quantities were obtained after administration of 0.2 and 1 μg of MCH compared to NaCl ($p < 0.05$) (Fig. 3, Table 2). Injection of 10 μg of MCH also induced an increase in SWS and a decrease in W quantities compared to NaCl, which did not reach statistical significance. No effect on SWS and W was seen with 0.02 and 5 μg doses compared to NaCl. The increase in SWS quantities following 0.2 and 1 μg MCH injections was maximal during the first two hours (0.2 μg, 69%; 1 μg, 73%) ($p < 0.05$) (Fig. 3, Table 2). The maximum decrease in W amounts was seen during the first 2 hours for 0.2 μg (-25%) and the third and fourth hours for 1 μg (-35%). The 0.2 and 1 μg MCH injections significantly increased SWS and decrease W quantities during 2 and 6 h compared to NaCl, respectively (Fig. 3, Table 2).

Discussion

In the present study, we found that a large majority of the MCH but not the hypocretin neurons were strongly immunoreactive to Fos specifically after a PS hypersomnia following 72 h of PS deprivation. Both types of cells were not immunoreactive to Fos in control condition or after the 72 h PS deprivation. Further, we found that ICV administration of 0.02, 0.2, 1 and 5 μg of MCH induces a dose dependent increase in PS and, to a minor extent, SWS quantities.

Our study is the first reporting the presence of Fos-immunoreactive neurons in the posterior hypothalamus after PS rebound. Indeed, previous studies examining Fos expression after PS hypersomnia focused on the brainstem [18–20]. Our results suggest that MCH neurons and also other populations of neurons intermingled with them and in adjacent structures, like the dorsal hypothalamic area, are specifically active during PS. They are supported by electrophysiological studies showing the presence of neurons strongly active during PS in the posterior hypothalamus [7,8]. Our results also indicate that hypocretin neurons are inactive during PS. They are in agreement with previous studies showing that Fos expression in hypocretin neurons is correlated positively with the amount of W and negatively with the amounts of SWS and PS during the 2 h prior to sacrifice [21]. Altogether, these and our results indicate that hypocretin are active during W and inactive during SWS and PS, while MCH neurons are active during PS.

The next step is to determine the role(s) of the MCH neurons during PS. It is unlikely that they are responsible for PS onset and maintenance since it is well accepted that PS generating structures are restricted to the brainstem [22]. However, MCH neurons could play a role in PS homeostasis. Indeed, reversible inactivation, by muscimol (a GABAa agonist) applications, of the region containing the MCH neurons induces a disappearance of PS [6]. Further, MCH fibers and receptors are present in the brainstem, in particular in reticular structures known to trigger PS like the sublaterodorsal, dorsal raphe nucleus and locus coeruleus nuclei [13].

To test the hypothesis that MCH neurons play a role in the homeostasis of PS, we studied the effect of ICV administrations at dark onset of MCH. Dark onset was chosen because the quantities of SWS and PS are minimal at this circadian time and an increase in their quantities was therefore more likely to be unraveled. We found that such injections induce a dose-dependant increase in PS and, to a minor extent, SWS quantities. These pharmacological results suggest that MCH neurons directly regulate PS and SWS quantities.

The mechanism of action remains to be determined. One possibility is that MCH increases PS via a direct excitation of the brainstem PS inducing neurons (PS-on neurons), in particular those located in the sublaterodorsal nucleus [23]. This seems however quite unlikely because MCH has been shown to be an inhibitory peptide [24,25] and

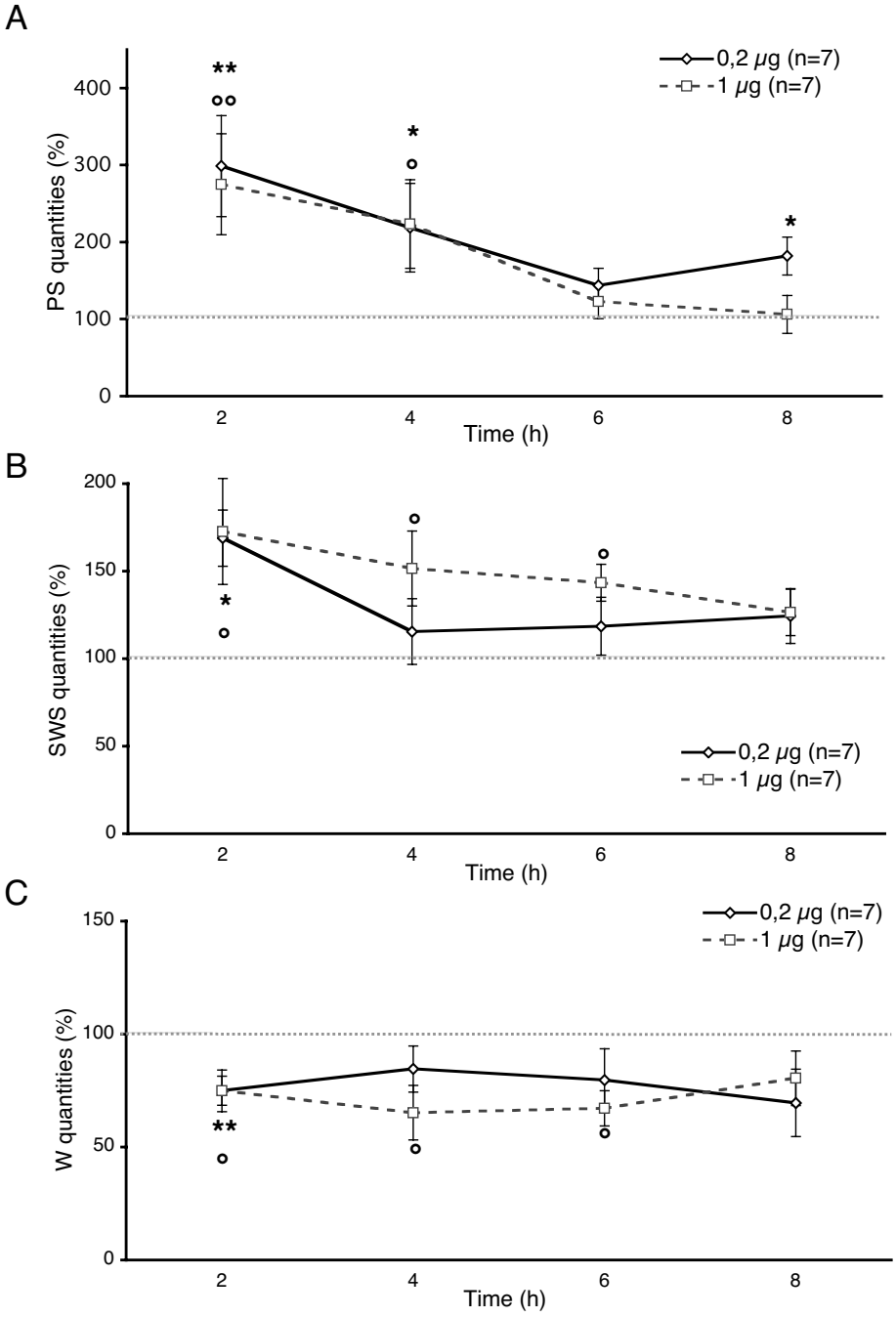


Figure 3

Increase of paradoxical sleep and slow wave sleep quantities by ICV administration of MCH. Administration of 0.2 μg (black line) and 1 μg (dashed line) of MCH induceda strong increase in the quantities of PS (A) and SWS (B) and a decrease in W (C) in male rats compared to NaCl (dotted line). The values are normalized to NaCl, NaCl corresponding to 100% of PS (A), SWS (B) or W (C). Significance values indicated for individual points are: 0.2 μg MCH versus NaCl (* $p < 0.05$, **$p < 0.01$), 1 μg MCH versus NaCl (° $p < 0.05$, ° °$p < 0.01$).

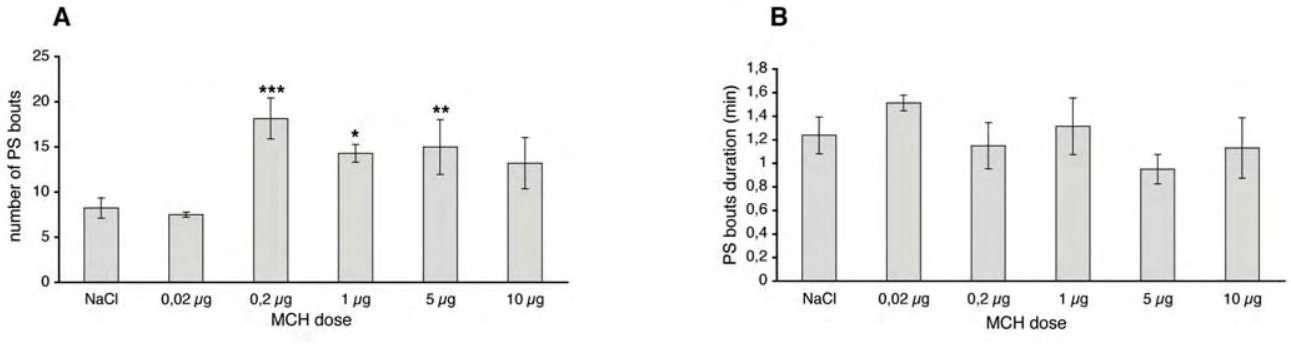


Figure 4
Increase in the number of PS bouts after ICV administration of MCH. Histograms illustrating the number of PS bouts (A) and their duration (B) during the first four hours following ICV administration of NaCl, 0.02, 0.2,1, 5 or 10 μg of MCH (mean ± SEM). There is a significant difference in the number of PS bouts between NaCl and MCH injections for 0.2, 1 and 5 μg. No difference in PS bouts duration was observed. Significance values indicated are for MCH versus NaCl injections (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

GABA has been shown to be co-localized with MCH [26]. It is therefore more likely that MCH neurons promote PS indirectly by inhibiting neurons themselves inhibiting the PS executive neurons during W and SWS (PS-off neurons). The monoaminergic neurons in the brainstem and the histaminergic neurons in the caudal hypothalamus belong to this category. They are active during W, decrease or nearly cease their activity during SWS and are silent during PS [7,27,28]. In previous studies, we have shown that GABA tonically inhibits the pontine PS executive neurons localized in the sublaterodorsal nucleus [23]. Further, we localized in the ponto-mesencephalic reticular formation the GABAergic neurons potentially responsible for this inhibition [29]. The increase of PS induced by MCH could therefore also be due to a direct inhibition of these GABAergic neurons.

Another possibility is that MCH neurons modulate SWS and PS quantities via an inhibitory action on the intermingled hypocretin neurons. Indeed, our and other [21] results indicate that hypocretin neurons are active during W and inactive during PS. In addition, disappearance of the hypocretins or invalidation of the receptor 2 for these peptides have been shown to induce narcolepsy in Human [9], mice [11] and dogs [10], the main feature of this disorder being sleepiness and PS attacks during W. Further, putative somasomatic, axosomatic and axodendritic contacts between hypocretin and MCH neurons have been observed, suggesting that MCH and hypocretin neurons are interconnected [15]. From these and our results, it can be hypothesize that MCH neurons might provide a tonic inhibition of the hypocretin neurons and by this way promote sleep.

Neurons containing MCH also project to forebrain structures such as the hippocampus and cortex [13,30,31]. Therefore, in addition to its role in PS homeostasis, the release of MCH on the cortical and hippocampal cells, specifically during PS, could also be involved in the induction of gamma and theta activities and oscillations observed on the EEG during PS. Additional studies are now necessary to determine the role of MCH release during PS in these brain territories.

Besides, it has been previously shown that central administration of 1.5 or 5 μg of MCH stimulates food intake while 0.15 and 0.5 μg doses are ineffective [32]. We found that lower doses (0.2 and 1 μg) more efficiently increase the quantities of PS, suggesting the existence of different modes of action of MCH on sleep and food intake. Additional studies are now necessary to unravel the link between the presumed role of MCH in sleep and nutritional homeostasis.

Conclusions

In conclusion, our results indicate that MCH is a powerful peptidergic hypnogenic factor. They further suggest that MCH-containing neurons play a crucial role in PS homeostasis in addition to energy balance [32–36]. Since MCH increases the quantities of PS but also those of SWS, it will be of interest to determine whether MCH agonists could be useful to treat sleep disorders such as insomnia.

Methods

Animals and surgery

All animals were housed and cared for according to the National Institute of Health "Guide for the care and use of

laboratory animals" (NIH publication 80–23). Male Sprague-Dawley rats (280–320 g, n = 25; IFFA Credo) were prepared for electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) monitoring under chloral hydrate anaesthesia (400 mg/kg, i.p.) as previously described [23]. They were placed under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on from 6:00 AM to 6:00 PM) and constant temperature (23°C) in a Plexiglas jar for at least 8 days of habituation.

Polygraphic recordings

EEG and EMG recordings were collected on a computer via a CED interface using the Spike 2 software (Cambridge Electronic Design). Vigilance states were discriminated with the aid of EEG and EMG data as previously described [23].

Paradoxical sleep deprivation procedure

PS deprivation was performed during 72 h using the classical flowerpot method [18,19,37]. Food and water were accessible *ad libitum* to animals. A 24 h baseline recording was first performed for all animals. Then, the rats were divided in control (PSC, n = 4), PS deprivation (PSD, n = 4) and PS rebound (PSR, n = 4) groups. The animals of the PSC group remained in their recording jar for 5 days before anaesthesia and perfusion at 5:00 PM. The animals of the PSD group were placed on platforms (6.5 cm in diameter) over water at 1:00 PM for three days and then anesthetized and perfused at ≅ 4:30 PM. The animals of the PSR group were placed on platforms for 72 h of PS deprivation and then back in their home cage for ≅ 3 h to allow a recovery of PS. They were anaesthetized for perfusion 150 min exactly after the first PS episode.

Neuroanatomical experiments

The PSC, PSD and PSR animals were perfused with a Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin, followed by 500 ml of a fixative composed of 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were postfixed for 2 h at 4°C and then stored for 2 days at 4°C in PB with 30% sucrose. The brains were rapidly frozen with CO_2 gas, sliced in 25 μm-thick coronal sections, and stored in PB containing 0.9% NaCl, 0.3% Triton X-100 and 0.1% sodium azide (PBST-Az). They were successively incubated in (i) a rabbit antiserum to Fos (1:5,000; Oncogene) in PBST-Az for 3 days at 4°C; (ii) a biotinylated goat antirabbit IgG solution (1:2,000; Vector Laboratories); and (iii) an ABC-HRP solution (1:1,000; Elite kit, Vector Laboratories) both for 90 min at room temperature. Finally, the sections were immersed in a 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB; Sigma), 0.003% H_2O_2 and 0.6% nickel ammonium sulphate. Two washes of 30 min were performed between each step.

The Fos stained sections were incubated the following day in a rabbit antiserum to either hypocretin (1:10,000; Phoenix Pharmaceutical) or MCH (1:100,000; Phoenix Pharmaceutical) in PBST-Az over 3 days at 4°C. Amplification steps were similar to those above but revelation was performed in DAB solution without nickel. Finally, the sections were mounted on slides, dried and coverslipped with DePex.

Cell counts and analysis of immunohistochemical data

Drawings of double-immunostained hemi-sections were made with a Leitz Orthoplan microscope equipped with an X/Y sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Historag, BIOCOM). Single and double-labeled neurons were counted in each hypothalamic structure present on one side of 6 MCH/Fos double-labeled sections and 4 hypocretin/Fos double-labeled sections.

ICV injections

For all rats, a guide cannula was implanted into the left lateral ventricle. Animals were allowed to recover for 3 days and were handled daily during 5 days prior to injection to minimize non-specific stress. Five microliters of MCH (0.02 μg, n = 4; 0.2 μg, n = 7; 1 μg, n = 7, 5 μg, n = 9 and 10 μg, n = 5 dissolved in 0.9% saline) or saline (n = 13) were administered at the rate of 1 μl/min at the beginning of the dark period (6:00 PM), with a stainless steel injector placed in the cannula and connected to an Hamilton syringe (Hamilton, Bonaduz, AG) by polythene tubing (id, 0.5 mm; od, 1 mm). All animals received at least one saline injection and one dose of MCH. After injection, animals returned to their jars and vigilance states were recorded for 8 h. The placement of the cannula was verified at the end of the study by microscopic examination of coronal counterstained brain sections.

Statistical analysis

ANOVA were performed on the different vigilance states across experimental conditions. A *post hoc* PLSD Fisher test was used to identify significant pairwise differences. The same tests were performed to compare cell counts between the animals groups in the different hypothalamic structures. Cell counts were correlated with physiological variables using a simple linear regression analysis. All statistics were performed using Statview 5.0.

Authors' contributions

LV carried out animal protocol for PS deprivation and rebound, immunochemistry, and performed statistical analysis for anatomical study. RG carried out animal protocol, implemented sleep studies and performed statistical analysis for ICV study. PF participated in the design of the animal protocols and anatomical studies. DS participated in the ICV study. PF and PHL conceived the studies.

Table 2: Quantities of PS, SWS and W after NaCl and MCH ICV injections.

Hours post-injection		0–2	2–4	4–6	6–8
PS	**NaCl**	3.4 ± 0.8	5.6 ± 1	10.8 ± 2.1	10.7 ± 2.1
	0.02 μg	8 ± 2 *	11 ± 0.6 *	13.1 ± 2.1	9.4 ± 4.3
	0.2 μg	10.1 ± 2.3 **	12.2 ± 2.6 *	15.6 ± 2.6	19.4 ± 3.3 *
	1 μg	9.3 ± 2.2 **	12.5 ± 3.2 *	13.3 ± 2.4	11.3 ± 2.6
	5 μg	5 ± 0.8	12.2 ± 2.3 **	12.4 ± 3.1	11.5 ± 2.4
	10 μg	5.8 ± 2.3	9.5 ± 1.5	10.8 ± 3.1	10.7 ± 3.2
SWS	**NaCl**	23.5 ± 4.4	39.1 ± 4.8	43 ± 5.2	44.7 ± 5.6
	0.02 μg	34.9 ± 5.8	34.6 ± 2.5	49.1 ± 2.1	39.3 ± 5.2
	0.2 μg	39.8 ± 3.8 *	45.1 ± 7.3	51 ± 7.1	55.6 ± 7
	1 μg	40.7 ± 7.1 *	59.2 ± 8.4 *	61.7 ± 4.6 *	56.6 ± 5.9
	5 μg	26.8 ± 5	45.9 ± 6.4	46.7 ± 7.2	40.8 ± 4.1
	10 μg	37.2 ± 7.8	55.4 ± 11.7	57.3 ± 3.4	51.1 ± 4.7
W	**NaCl**	93.5 ± 4.7	74 ± 5.4	66.9 ± 6.8	64.7 ± 7.3
	0.02 μg	77.1 ± 7.8	74.5 ± 2.4	57.8 ± 2.3	71.3 ± 9.5
	0.2 μg	70.1 ± 6 **	62.6 ± 7.6	53.3 ± 9.3	45 ± 9.7
	1 μg	70.1 ± 8.6 *	48.3 ± 9 *	45 ± 5.2 *	52.1 ± 7.8
	5 μg	91.4 ± 6.7	63.1 ± 7.4	59.7 ± 10.1	68.3 ± 5.7
	10 μg	74.8 ± 10.6	55.2 ± 10.8	49.4 ± 2.4	56.5 ± 6.8

The quantities (mean ± SEM) of PS, SWS, and W following NaCl or MCH administrations are reported in minutes per 2 hours. Significance values indicated for individual points compared to NaCl are * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

CP, LL and PS provided useful discussion. LC, LL, CP, PS and RB participated in the design and coordination of the studies. LV and PHL drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS (FRE2469 and UMR5167), INSERM (U480) and Université C. Bernard Lyon I. L. Verret and R. Goutagny received a PhD grant from the "Ministère de la Recherche" and the "Région Rhône-Alpes", respectively. We thank N. Vautrelle and also J. Trouillas, B. Renaud for their help.

References

1. Dement WC: **The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1958, **10:**291-296.
2. Jouvet M, Michel F and Courjon J: **Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique.** *CR Seances Soc Biol* 1959, **153:**1024-1028.
3. Aserinsky E and Kleitman Nathaniel: **Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep.** *Science* 1953, **118:**273-274.
4. Dement W and Kleitman N: **The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming.** *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition* 1957, **53:**339-346.
5. Jouvet M: **Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique.** *Arch Ital Biol* 1962, **100:**125-206.
6. Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G and Jouvet M: **A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats.** *Brain Res* 1989, **479:**225-240.
7. Steininger TL, Alam MN, Gong H, Szymusiak R and McGinty D: **Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat.** *Brain Res* 1999, **840:**138-147.
8. Alam MN, Gong H, Alam T, Jaganath R, McGinty D and Szymusiak R: **Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area.** *J Physiol* 2002, **538:**619-631.
9. 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 GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S and Mignot E: **A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains.** *Nat Med* 2000, **6:**991-997.
10. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S and Mignot E: **The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene.** *Cell* 1999, **98:**365-376.
11. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB and Yanagisawa M: **Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation.** *Cell* 1999, **98:**437-451.
12. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG and Kilduff TS: **Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems.** *J Neurosci* 1998, **18:**9996-10015.
13. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W and Sawchenko PE: **The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization.** *J Comp Neurol* 1992, **319:**218-245.
14. Brischoux F, Fellmann D and Risold PY: **Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis.** *Eur J Neurosci* 2001, **13:**1733-1744.
15. Bayer L, Mairet-Coello G, Risold PY and Griffond B: **Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons.** *Regul Pept* 2002, **104:**33-39.
16. Morgan JI and Curran T: **Role of ion flux in the control of c-fos expression.** *Nature* 1986, **322:**552-555.
17. Dragunow M and Faull R: **The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing.** *J Neurosci Methods* 1989, **29:**261-265.
18. Maloney KJ, Mainville L and Jones BE: **Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after para-**

doxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 1999, **19:**3057-3072.
19. Maloney KJ, Mainville L and Jones BE: **c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery.** *J Neurosci* 2000, **20:**4669-4679.
20. Maloney KJ, Mainville L and Jones BE: **c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery.** *Eur J Neurosci* 2002, **15:**774-778.
21. Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB and Scammell TE: **Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state.** *J Neurosci* 2001, **21:**1656-1662.
22. Jouvet M: **The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle.** *Ergeb Physiol* 1972, **64:**166-307.
23. Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P and Luppi PH: **The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study.** *Eur J Neurosci* 2002, **16:**1959-1973.
24. Gao XB and van den Pol AN: **Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus.** *J Physiol* 2001, **533:**237-252.
25. Gao XB and van den Pol AN: **Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons.** *J Physiol* 2002, **542:**273-286.
26. Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB and Elmquist JK: **Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus.** *J Comp Neurol* 2001, **432:**1-19.
27. Gervasoni D, Darracq L, Fort P, Souliere F, Chouvet G and Luppi PH: **Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep.** *Eur J Neurosci* 1998, **10:**964-970.
28. Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P and Luppi PH: **Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons.** *J Neurosci* 2000, **20:**4217-4225.
29. Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B and Luppi PH: **Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurones projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset.** *Eur J Neurosci* 2003, **In press:**.
30. Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F and Civelli O: **Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor.** *Nature* 1999, **400:**265-269.
31. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S and Leslie RA: **The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat.** *Eur J Neurosci* 2000, **12:**1194-1216.
32. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R and Maratos-Flier E: **A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour.** *Nature* 1996, **380:**243-247.
33. Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS and Maratos-Flier E: **Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance.** *J Clin Invest* 2001, **107:**379-386.
34. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH and Qian S: **Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99:**3240-3245.
35. Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA and Bloom SR: **Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight.** *Endocrinology* 1997, **138:**351-355.
36. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS and Maratos-Flier E: **Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean.** *Nature* 1998, **396:**670-674.
37. Mendelson W: **The flower pot technique of rapid eye movement sleep deprivation.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1974, **2:**553-556.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

BioMedcentral

Discussion et conclusion

Il a été récemment montré que les neurones à Hcrt expriment le marqueur fonctionnel Fos pendant l'éveil témoignant de leur activation liée à cet état (Estabrooke et coll. 2001). En revanche, nos connaissances ne permettaient pas de déterminer leur implication potentielle dans la régulation du sommeil paradoxal (SP). Nous avons donc étudié la distribution des neurones à Hcrt exprimant Fos après hypersomnie en SP chez le rat. De manière inattendue, nous avons observé que le rebond de SP est accompagné d'une très forte augmentation du nombre de cellules activées (Fos+) dans l'hypothalamus posterieur par rapport aux autres conditions expérimentales. Cependant, un très faible nombre de ces neurones présente également une immunoréactivité à l'Hcrt (2±1,5 cellules Hcrt/Fos+ par coupe, soit environ 2% seulement des neurones Hcrt, valeurs statistiquement non différentes de celles des autres groupes expérimentaux). Ces données anatomo-fonctionnelles démontrent que les neurones Hcrt ne sont pas activés pendant le rebond de SP, renforçant l'hypothèse de leur rôle prépondérant dans la régulation de l'éveil.

En revanche, et contrairement aux neurones Hcrt, nous avons montré que la majorité des neurones MCH sont très fortement activés pendant le rebond de SP (113±5 cellules MCH/Fos+ par coupe, soit environ 60% des neurones MCH, valeurs statistiquement différentes de celles des autres groupes expérimentaux). Nos résultats indiquent donc que les neurones MCH, et d'autres populations neuronales de l'HP encore non-identifiées, sont spécifiquement actifs durant le SP. Ils ne nous permettent cependant pas de déterminer si les neurones MCH jouent un rôle actif dans la régulation du SP ou bien si leur activation est la conséquence de cet état de vigilance. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'effet de l'injection ICV de MCH sur le cycle veille-sommeil chez le rat. Ainsi, la MCH, administrée à faible dose (0,2 µg et 1 µg), double les quantités de SP alors que les quantités de SL sont augmentées de 70 % par rapport aux administrations témoins de NaCl chez les mêmes animaux.

Comment les neurones à MCH peuvent-ils réguler les quantités de SL et de SP ? L'une des possibilités serait que les neurones à MCH activent directement les neurones ponto-bulbaires responsables de la genèse du SP (en particulier les neurones du noyau sub-latéro dorsal, ou SLD (Boissard et coll., 2002)). Cependant, cette hypothèse parait peu probable. En effet, il a

été démontré que la MCH est un peptide inhibiteur (Gao et van den Pol 2001; Gao et van den Pol 2002), et que les neurones à MCH co-expriment le GABA (Elias et coll. 2001). De plus, nous n'avons pu mettre en évidence qu'une très faible projection des neurones à MCH sur le SLD (Lucienne Léger, communication personnelle).
Il est donc plus vraisemblable que les neurones à MCH participent à la régulation du SP en allant inhiber les structures elles-mêmes inhibant les neurones exécutifs du SP, tels les neurones du LC, du NRD ou de la vlPAG/DPMe (Cf. Rappels bibliographiques). En accord avec cette hypothèse, un grand nombre de fibres MCH sont localisées au sein de ces noyaux.
Une autre possibilité serait que les neurones MCH régulent les quantités de SL et de SP en agissant sur les neurones à hypocrétine voisins. En effet, il a été suggéré une interconnexion entre les neurones à Hcrt et les neurones à MCH (Bayer et coll. 2002). De plus, il est connu que les neurones Hcrt sont à l'origine de projections excitatrices directes sur les neurones NA du LC, 5-HT du NRD, HA du TMN… (Pour revue, voir (Goutagny et coll. 2004). Ainsi, l'inhibition des neurones Hcrt provoquerait une diminution de l'activité des neurones monoaminergiques, étapes nécessaires à la survenue du sommeil.

Notre étude démontre pour la première fois que la MCH est un facteur hypnogène puissant et que les neurones sécrétant cette hormone pourraient jouer un rôle clef dans la régulation du SP. Ces données sont difficile à réconcilier avec les expériences princeps de jouvet (Jouvet 1962) montrant que seules les structures ponto-bulbaires sont responsables de la genèse et du maintien du SP. Cependant, il est important de rappeler que le SP disparaît progressivement en faveur de l'éveil dans les cinq jours qui suivent la préparation des chats pontiques. D'autre part, aucun rebond de SP n'est observé lorsque ces animaux sont soumis à une privation sélective de cet état (Jouvet 1962; Jouvet 1988). Ces observations suggèrent que le tronc cérébral contient les structures responsables de l'apparition du SP, mais pas celles nécessaires à son homéostasie. En revanche, si un isolat d'hypothalamus est laissé intact dans le crâne lors d'une préparation pontique sur le chat, alors ces animaux présentent des quantités normales de SP et peuvent survivre plusieurs mois. Ainsi, les neurones MCH ne joueraient pas un rôle dans la régulation ultradienne du SP (génèse et durée du SP), mais plutôt dans sa régulation homéostasique et/ou circadienne comme le suggère les relations réciproques entre les neurones à MCH et ceux du noyau supra-chiasmatique (NSC, centre régulateur des rythmes circadiens, (Abrahamson et coll. 2001). Afin de confirmer cette hypothèse, l'enregistrement polysomnographique de souris invalidées pour la MCH, son récepteurs ou de souris présentant une destruction sélective des neurones MCH (souris ataxine-MCH) semble être une

approche de choix. Ainsi, ces souris devraient présenter sinon une diminution des quantités basales de SP, du moins une altération de sa régulation (rebond de SP suite à sa privation sélective…).

Enfin, la MCH était connue jusque là pour jouer un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire et de la masse pondérale. Nos données suggèrent donc l'existence d'une relation prise alimentaire/sommeil. Une étude récente confirme cette hypothèse. Il a en effet été montré que l'activité des neurones à MCH était régulée en partie par le taux de glucose cérébral (Burdakov et coll. 2005). Plus précisément, un fort taux de glucose cérébral activerait les neurones MCH tout en inhibant les neurones Hcrt, favorisant de ce fait le sommeil, alors qu'un taux faible de glucose inhiberait les neurones MCH et activerait les neurones Hcrt, favorisant l'éveil et la recherche de nourriture. Ainsi, les neurones MCH seraient à l'interface entre les systèmes régulant le métabolisme et le cycle veille-sommeil.

En plus de la régulation du SP, les neurones à MCH pourraient également être impliqués dans des évenements associés à cet état de vigilance, comme la modulation des activités thêta et gamma, ou les phénomènes de consolidations mnésiques intervenant durant le SP. En effet, les neurones à MCH projettent au cortex et à l'hippocampe (Bittencourt et coll. 1992; Saito et coll. 1999; Hervieu et coll. 2000). De même, il été montré que les souris invalidées pour les récepteurs 1 de la MCH présentaient une altération des performances lors de l'apprentissage d'une tâche dépendante de l'hippocampe (Adamantidis et coll. 2005).

En conclusion, nous avons démontré le rôle de la MCH, population neuronale hypothalamique, dans la régulation du SP. Ainsi, les réseaux neuronaux responsables de la genèse et du maintien du SP ne sont pas uniquement localisés dans la partie caudale du cerveau (région ponto-bulbaire). Il existerait donc des interactions hypothalamo-ponto-bulbaires dont la mise en jeux serait une étape importante pour la régulation du SP.

Chapitre 3 :

Régulation GABAergique des neurones à MCH au cours du cycle veille-sommeil

Introduction

Comme décrit dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence que les neurones MCH sont activés durant le rebond de SP. Cependant, il est important de rappeler que tous les neurones de l'hypothalamus activés pendant le rebond de SP ne sont pas de nature MCHergique. En effet, les neurones doublement marqués MCH+/c-Fos+ représentent 76% des neurones Fos+ de la région périfornicale, 60% des neurones Fos+ de l'aire hypothalamique latérale et seulement 30% des neurones Fos+ de la zona incerta.
Ces données indiquent donc que les neurones de l'hypothalamus présumés actifs uniquement durant le SP présentent une hétérogénéité au niveau de leur nature neurochimique.

Afin de corréler ces données d'anatomie fonctionelle à des enregistrements in-vivo et de déterminer si les neurones MCH sont bien de types SP-on, nous avons effectué des enregistrements électrophysiologiques de l'aire périfornicale et de l'aire hypothalamique latérale (PF-LHA) de l'hypothalamus postérieur sur le rat non anesthésié, avec une attention particulière pour les neurones de types SP-on.

De plus, comme décrit dans le Chapitre 1, le GABA est le principal neurotransmetteur impliqué dans la régulation du SP. Les neurones à MCH, s'ils sont bien de nature SP-on, pourraient être inhibés par le GABA durant l'EV et le SL. Ainsi, l'injection d'un antagoniste GABAergique à proximité de ces neurones devrait les activer, et donc provoquer une hypersomnie en SP. Afin de tester cette hypothèse, nous avons observé l'effet sur les états de vigilance d'une désinhibition restreinte de cette région (par l'injection iontophorétique de bicuculline, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$).

Enfin, afin de déterminer si les neurones MCH sont effectivement activés suite à cette injection pharmacologique, nous avons effectué des éjections iontophorétiques de longues durées nous permettant ainsi de coupler l'immunohistochimie du c-Fos avec celle de la MCH et de l'Hcrt.

Ce travail fait l'objet d'un article publié dans *NeuroReport*.

GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep–waking cycle

Romain Goutagny,[1,2] Pierre-Hervé Luppi,[1,2] Denise Salvert,[1,2] Damien Gervasoni[3] and Patrice Fort[1,2,CA]

[1]CNRS, UMR 5167, Faculté de Medecine, RTH Laennec, 7 rue G. Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France; [2]Université Claude Bernard – Lyon I, Villeurbanne, F-69622, France; [3]Departments of Neurobiology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA

[CA,1]Corresponding Author and Address: patrice.fort@sommeil.univ-lyon1.fr

Received 6 April 2005; accepted 29 April 2005

The perifornical-lateral hypothalamic area is implicated in regulating waking and paradoxical sleep. The blockade of $GABA_A$ receptors by iontophoretic applications of bicuculline (or gabazine) into the perifornical-lateral hypothalamic area induced a continuous quiet waking state associated to a robust muscle tone in head-restrained rats. During the effects, sleep was totally suppressed. In rats killed at the end of a 90 min ejection of bicuculline, Fos expression was induced in ≈28% of the neurons immunoreactive for hypocretin and in ≈3% of the neurons immunostained for melanin-concentrating hormone within the ejection site. These results suggest that neurons containing melanin-concentrating hormone are not active during waking and that the lack of a potent GABAergic influence during waking is consistent with their role in sleep regulation. *NeuroReport* 16:1069–1073 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Bicuculline; Fos; Head-restrained rat; Hypocretin; Lateral hypothalamic area; Melanin-concentrating hormone; Perifornical nucleus; Rapid eye movement sleep; Waking

INTRODUCTION

The perifornical-lateral hypothalamic area (PeF-LH) serves as the main brain center integrating endocrine and autonomic responses, energy homeostasis and vigilance. Several studies have demonstrated that the hypocretin (Hcrt)-containing neurons in PeF-LH are crucial for maintaining the level of arousal [1] and the loss of Hcrt in humans and mice is linked to narcolepsy [2]. Rare observations suggest that this area is required for paradoxical sleep (PS) [3]. In pontine cats, in which all brain structures rostral to the brainstem were removed, PS-like episodes still occured during the acute survival period [4]. In contrast, if the rostral brain is left intact but separated from the brainstem, cats present normal PS and can survive several months [4]. Finally, the hypothalamic inactivation by muscimol [γ-aminobutyric acid type A receptor ($GABA_A$) agonist] induces a disappearance of waking and PS [5]. To identify the subpopulation of neurons involved in PS, we recently combined immunohistochemistry for Fos, Hcrt and melanin-concentrating hormone (MCH) in rats with enhanced PS consecutive to a PS deprivation [6]. In these rats, we observed a very high number of Fos+/MCH+ cells in the PeF-LH and a negligible number of Fos+/Hcrt+ neurons. These data suggest that MCH neurons are among the PeF-LH neurons, those implicated in PS regulation. To test this hypothesis, we used here the head-restrained rat model [7,8] to record single-unit activity of PeF-LH neurons during the spontaneous sleep–waking cycle, and simultaneously studied the effect of iontophoretic application of bicuculline or gabazine ($GABA_A$ antagonists) on the vigilance states. We further combined Fos, MCH and Hcrt immunostaining to identify the populations of neurons activated by the focal blockade of the GABAergic inhibitory neurotransmission.

MATERIALS AND METHODS

Surgery: The procedure (fixation of the head-restraining system and chronic implantation for the polygraphic recordings) has been previously described in detail [7,8]. Male Sprague–Dawley rats (280–320 *g*, *n*=6; IFFA Credo, France) were used, housed and cared for according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 80–23; Authorization no. 03-505 of the French Ministry of Agriculture). After recovery (2 days), the rats were habituated to the restraining and recording system for 8–10 days. At the end of the training, they could stay calm for 5–6 h daily sessions during which active waking (with movements, AW), quiet waking (without movement, W), slow wave sleep (SWS) and PS were routinely observed. During the two following days, extracellular unit recordings from PeF-LH neurons were carried out with a single glass microelectrode to delineate in each rat the area for subsequent local pharmacology.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Protocol: Drugs were applied iontophoretically for five to seven consecutive daily recording sessions during the light-on sleep period. For this purpose, a multi-barrel micropipette ($\leq$20 µm tip diameter) was lowered slowly with a piezoelectric positioner (IW-800, Burleigh, Victor, New York, USA) into the area containing PS-on and W-on neurons. Each barrel was filled with one of the following solutions: bicuculline methiodide (Bic, 10 mM, pH 4; Sigma, St Louis, Missouri, USA); gabazine (Gbz, 5 mM, pH 3.8; Sigma); NaCl 0.9%; Phaseolus vulgaris leucoaglutinin (PHA-L, 1%, Vector Lab., Burlingame, California, USA) or cholera-toxin b subunit (CTb, 0.5%, List Biol Lab., Cambell, California, USA). Once the pipette was in place, Bic was ejected iontophoretically for 15 min at 100 nA. When an effect was produced, saline (15 min, 100 nA) was injected in the same site at least 45 min after the end of the Bic effect. In some cases, a third injection of Gbz (15 min, 100 nA) was applied at least 30 min after the end of the saline ejection. When the first ejection of Bic was ineffective, a second ejection was made 30 min later, 500 µm away from the first site. For each rat, one injection of tracer (PHA-L, CTb) was applied in the first Bic-positive ejection site. On the final day of experimentation, each rat received a continuous 90 min ejection of Bic or saline (100 nA) in a previous Bic-positive ejection site. At the end of the ejection, the rats were killed under anesthesia (chloral hydrate, 400 mg/kg) and perfused transcardiacally with a fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M phospahte buffer, pH 7.4).

Data analysis: The vigilance state was determined throughout the experiment on 10 s epochs by visual inspection of the electromyogram (EMG) and electroencephalogram (EEG) traces and the EEG power spectrum; four states, AW, W, SWS and PS were scored [7] and the hypnogram was drawn using a homemade script in Spike-2 software (CED, Cambridge, UK). The mean and standard deviation (SD) of the rectified EMG was calculated on 10 s epochs of AW, W, SWS and PS before ejection and during the effect of Bic or Gbz. The effect latency was defined as the time-interval between the onset of drug application and the moment at which the mean rectified EMG value reached a value greater than spontaneous W + 2SD. The duration of effects was defined as the time-interval between the effect onset and the moment at which the mean rectified EMG value returned to a baseline value. The EEG spectral power in selected frequency bands was calculated with a Spike-2 script computing a fast Fourier transform on 10 s EEG epochs (0.1 Hz resolution). Frequency bands were defined as δ (1–5 Hz), θ (5–9 Hz), σ (9–15 Hz), $\beta 1$ (15–20 Hz), $\beta 2$ (20–30 Hz) and γ (30–48 Hz). The θ/δ power ratio was also calculated. The mean $\pm$ SEM of EMG and EEG variables were calculated for the effect of Bic or Gbz and compared with those observed with saline injections using ANOVA followed by *post hoc* Fisher tests.

Neuroanatomy: To localize the Bic-positive ejection sites, 25-µm-thick coronal sections at the level of the PeF-LH were submitted to the immunohistochemical detection of either Fos (1/5000; Oncogene, Cambridge, Massachusetts, USA), CTb (1/40 000; List Biol Lab.) or PHA-L (1/5000; DAKO, Denmark), revealed by the standard DAB-Ni reaction. The same sections were then submitted to the immunodetection of either Hcrt (1/10 000) or MCH (1:100 000; Phoenix Pharmaceutical, St Joseph, Missouri, USA) by the DAB without Ni reaction, as previously described [6]. The number of Hcrt+, MCH+, Fos+, Fos+/Hcrt+ and Fos+/MCH+ neurons was determined in six rats (n=4 for Bic; n=2 for saline) with a computerized image-analysis system (ExploraNova, La Rochelle, France); Fos+/Hcrt+ neurons were counted on six hemi-sections per rat taken every 100 µm, while Fos+/MCH+ neurons were counted on eight hemi-sections per rat.

RESULTS

In agreement with previous studies in rats [9,10], we found in the PeF-LH a large number of PS-on neurons (n=22/32 cells recorded at least during one sleep–waking cycle) with a firing rate significantly higher during PS (20.6 $\pm$ 3.8 Hz) than during W (6.1 $\pm$ 1.6 Hz) and SWS (5.5 $\pm$ 1.4 Hz) ($p<0.001$, ANOVA, *post hoc* Fisher test). A smaller number of W-on neurons (n=6/32) presented a maximal firing activity during W (5.2 $\pm$ 1.7 Hz) that decreased during SWS (1.6 $\pm$ 1.02 Hz). Firing virtually ceased during PS (0.4 $\pm$ 0.2 Hz), although brief spiking occurred in association with phasic motor twitches (Fig. 1). Their discharge rate was highly positively correlated with the rectified EMG amplitude (R=0.48; t=5.96, $p<0.001$).

The ejection of Bic (n=10, 15 min, six rats) in the PeF-LH area containing PS-on and W-on neurons induced a continuous EEG activation associated with a robust increase of the EMG rectified amplitude (Fig. 2). This waking effect occurred after a latency of 4.3 $\pm$ 0.5 min and lasted 16.7 $\pm$ 0.9 min. During effects, sleep was blocked as compared with during saline ejections (n=10; SWS, 65.3 $\pm$ 3.1% and PS, 7.3 $\pm$ 2.4% of the recording time, $p<0.001$; Student's t-test). The ejections of Gbz (n=4, 15 min, 2 rats) induced a similar effect (latency, 4.2 $\pm$ 0.5 min; duration, 25.2 $\pm$ 0.9 min) with sleep disappearance compared with saline ejections (n=4; SWS 55.4 $\pm$ 3.9% and PS, 4.3 $\pm$ 0.4% of the recording time). During pharmacological effects, the rats stayed calm, with occasional adjustment of the body posture, eyes opened and vibrissae movements with sniffing behavior.

The spectral analysis of the EEG during Bic effects revealed no difference from quiet W during saline ejections (Table 1). Compared with control AW, we found a significant decrease in the power of sigma band and in the ratio θ/δ. Furthermore, the amplitude of the rectified EMG during the effect was significantly higher than for AW and quiet W during saline ejections (Table 1, Fig. 2). Finally, Bic applied laterally (n=4), dorsally (zona incerta, n=3) or ventrally (ventromedial hypothalamic nucleus, n=2) to the PeF-LH did not induce any modification of the sleep–waking cycle compared with saline ejections.

For long-lasting Bic applications in the PeF-LH (n=4), the same waking state appeared with a latency of 4.8 $\pm$ 0.3 min and was sustained throughout the ejection with a sleep loss for 90 min. In these rats, a very large number of Fos+ neurons were observed within a radius of 350–500 µm from the ejection locus. On double-stained sections (Fos/MCH and Fos/Hcrt), the ejection sites were located within the area containing MCH+ and Hcrt+ neurons, indicating that the diffusion of Bic produced an activation restricted to the PeF-LH. Almost no MCH+ neurons within the ipsilateral PeF-LH expressed Fos ($\approx$3% of the MCH+ neurons), whereas a much greater proportion of the Hcrt+ neurons

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

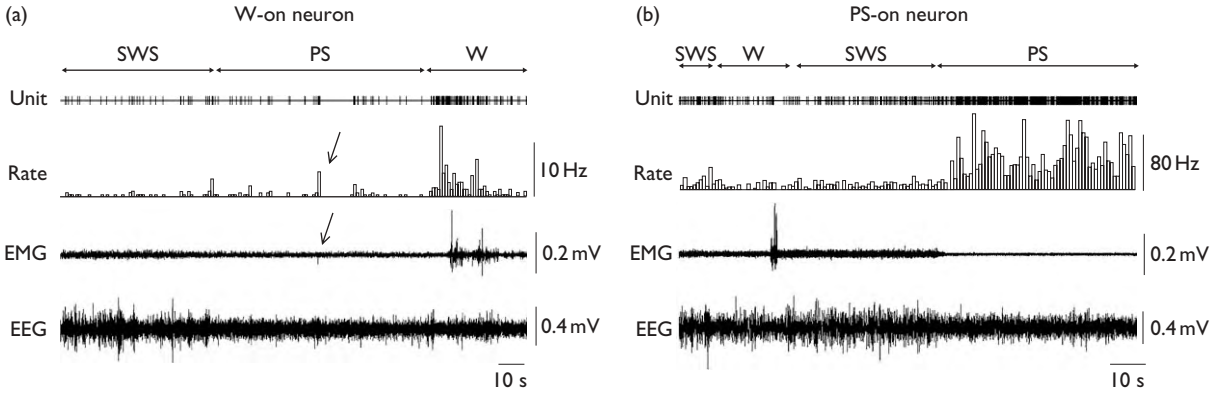


Fig. 1. Discharge patterns of a 'wake-on' (W-on) neuron (**a**) and a 'paradoxical sleep-on' (PS-on) neuron (**b**) recorded across the sleep–waking cycle in the perifornical-lateral hypothalamic area. (a) the firing rate of this presumed hypocretin-containing neuron increased during quiet waking (W) compared with slow wave sleep (SWS) and PS. Notice the brief spiking occurring in association with a phasic motor jerk during PS (arrows). (b) this PS-on neuron exhibited a considerably higher firing rate during the bout of PS judged by the electroencephalogram (EEG) activation associated to the muscle atonia, than during the preceding W and SWS episodes.

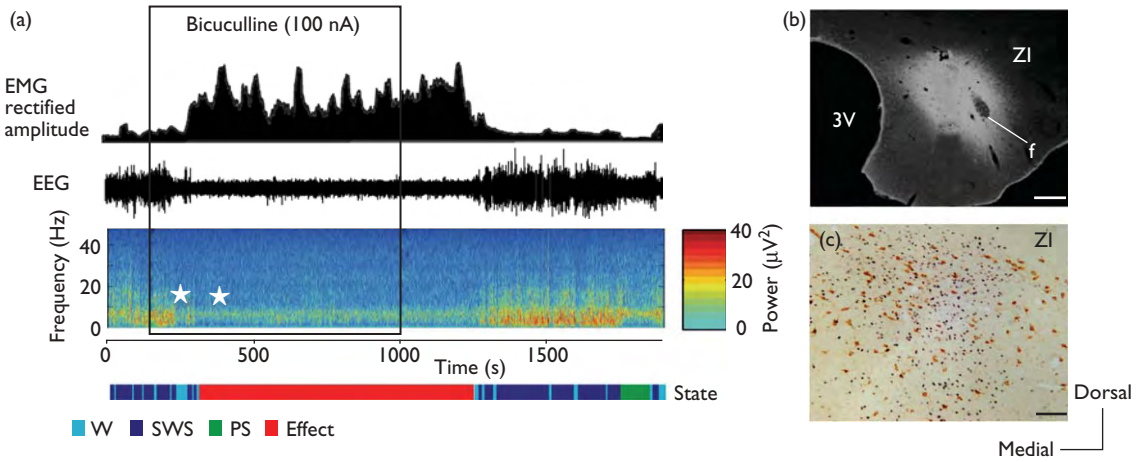


Fig. 2. (**a**) Effect of an iontophoretic ejection of bicuculline into the perifornical-lateral hypothalamic area (PeF-LH) (100 nA, 15 min) on the vigilance state and electromyogram (EMG) activity. The electroencephalogram (EEG) spectrogram was obtained using the 'specgram.m' function of Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). For this purpose, a sliding window Fourier transform was applied to the EEG signal using a 1-s window with a 0.25 s overlap. (**b**) Photomicrograph showing a phaseolus vulgaris leucoagglutinin ejection site within the PeF-LH dorsal to the Fornix. A 15-min bicuculline methiodide (Bic) ejection in the same site produced a waking effect with a robust increase of muscle tone. (**c**) Photomicrograph showing a frontal section double-stained with Fos (in black) and melanin-concentrating hormone (MCH) (in brown) immunohistochemistry in a rat which received an effective Bic ejection for 90-min into the PeF-LH just before being killed. Note the overlapping distribution of the numerous Fos+ and MCH+ neurons within the ejection locus. *Abbreviations*: 3V, third ventricle; f, Fornix; ZI, Zona Incerta. *Bars*: 250 μm (b) and 100 μm (c).

Table 1. Electroencephalogram (EEG) power spectrum and electromyogram (EMG) rectified amplitude during the bicuculline (Bic) effects versus control active waking (AW), quiet waking (W), slow wave sleep (SWS), paradoxical sleep (PS) during saline ejections.

	EEG band amplitudes (% of total spectral amplitude)						Ratio θ/δ	EMG rectified amplitude
	δ	θ	σ	β1	β2	γ		
Bic effect	20±1	36±1	14±0	9±0	13±1	9±0	1.9±0.1	0.43±0.1
AW	19±0	34±2	16±1*	9±0	14±1	9±1	2.6±0.4*	0.19±0.04***
W	21±1	32±1	14±1	10±1	13±1	10±1	1.7±0.2	0.11±0.02**
SWS	38±2***	29±1*	14±1	8±0	6±1***	4±0***	0.8±0.1***	0.10±0.02***
PS	12±0**	43±2*	15±2	10±0	13±0	7±1	3.8±0.4***	0.1±0.01***

A one-way ANOVA was performed and Fisher's test was used for *post hoc* comparisons. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ NaCl compared with Bic ejections.

were Fos-positive (≈28% of the Hcrt+ neurons). Rats with a saline ejection in the PeF-LH (n=2; 90 min) presented little or no Fos labeling in the ejection locus.

DISCUSSION

Here we show that the focal blockade of $GABA_A$ receptors by iontophoretic application of bicuculline (Bic) in the

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

PeF-LH induced an uninterrupted waking state with an EEG activity similar to quiet W concomitant with a sustained muscle tonus. A suppression of sleep was obtained as long as Bic was ejected. These effects were reproduced by the iontophoretic ejection of Gbz in the same sites, thus ruling out a nonspecific neuronal activation [11]. Our result differs notably from the arousal effect of a microdialysis perfusion of Bic into the PeF-LH reported in freely moving rats, where SWS and PS could still be observed and sleep amounts were reduced at the expense of active waking (AW) [12]. However, in this study, the vigilance states were scored visually without *offline* analysis of EEG (fast Fourier transform) and EMG (rectified amplitude) signals, used here to distinguish the waking-induced state from the standard AW (a sustained muscular activity combined with an increased θ power and peak frequency compared with quiet W). Technical aspects might also explain the discrepant results. First, a lower local concentration of Bic might be obtained with microdialysis (2–20 μM for 60–120 min) [12], as opposed to iontophoresis [13] and might thus account for the persistence of sleep. Second, as shown by the extension of Fos labeling, the iontophoretic ejection of Bic leads to a more limited diffusion of the antagonist (350 vs. 750 μm radius), thus allowing a neuronal activation restricted to the area containing intermingled Hcrt+ and MCH+ neurons. And third, successive ejections with small diameter multibarrel pipettes cause little tissue damage and a very low Fos basal expression within the ejection sites [7,8]. In contrast, chronically implanted microdialysis probes produce larger tissue damage along the track and a robust expression of Fos around the probe (see Fig. 2 in [12]).

The quiet waking and sustained muscle tone induced by Bic on our experiments was accompanied by a striking increase of Fos expression in Hcrt+ neurons compared with saline (28% vs. 0% of the Hcrt+ cells). Similar data were obtained following the microdialysis of Bic (21% vs. 3% of the Hcrt+ cells [12]) and large AW amounts. A recent study reported that Hcrt+ neurons were not Fos+ and were thus not activated during quiet W in the absence of motor activity in freely moving cats [14]. Furthermore, congruent electrophysiological data, including our present ones, indicate that the firing activity of presumed Hcrt-containing neurons is rather correlated to EMG amplitude than to EEG activity across the sleep–waking cycle [9,10,15]. Taken together, these data suggest that Hcrt+ neurons are primarily involved in motor functions that secondarily contribute to the maintenance of waking but are quiescent during sleep. It is likely that their reduced activity during sleep is due to a GABAergic inhibition that would build progressively during W and remain elevated throughout SWS and PS, as shown for other wake-promoting systems [7,16–19].

Consistently, with their presumed activity during sleep [6], we showed that very few MCH+ neurons, if any, were also labeled for Fos during arousal induced by Bic ejection. This finding remains surprising because MCH neurons are known to express $GABA_A$ receptors and are hyperpolarized by muscimol *in vitro* [20,21]. Although its concentration likely increases during sleep in the vicinity of MCH+ neurons [17], GABA may not be the only neurotransmitter responsible for their inactivity during W. Other arousal-related neurotransmitters such as noradrenaline and serotonin also evoke direct inhibitory action in MCH neurons recorded *in vitro* [21,22]. The noradrenergic and serotoninergic brainstem neurons are active during W and diminish firing during SWS to become silent during PS [7,16,23]. The progressive removal of monoaminergic inputs during sleep would thus facilitate the activation of MCH neurons, as for the sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus [24]. Finally, a recent in-vitro study provides evidence that glucose directly excites MCH neurons and would thus promote rest and energy conservation when body energy resources are high [25]. Conversely, a decreased excitability of MCH neurons caused by a fall in glucose would suppress sleepiness and promote activity for effective food seeking. It is thus possible that MCH neurons might be at the interface between metabolic and arousal-regulatory systems, a suitable place to contribute to the homeostatic regulation of sleep.

CONCLUSION

The functional evidence taken from the present study is consistent with our leading hypothesis that MCH neurons are not active during waking and rather play a role during sleep. Additional studies are required to identify the neurotransmitters contributing to their increased activity during sleep.

REFERENCES

1. Sakurai T. Roles of orexins in the regulation of feeding and arousal. *Sleep Med* 2002; **3(Suppl. 2)**:S3–S9.
2. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y *et al*. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000; **6**:991–997.
3. Goutagny R, Verret L, Fort P, Salvert D, Leger L, Luppi PH *et al*. Posterior hypothalamus and regulation of vigilance states. *Arch Ital Biol* 2004; **142**:487–500.
4. Jouvet M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 1972; **64**:166–307.
5. Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res* 1989; **479**:225–240.
6. Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L *et al*. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 2003; **4**:19.
7. Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N *et al*. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 2000; **20**:4217–4225.
8. Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 2002; **16**:1959–1973.
9. Alam MN, Gong H, Alam T, Jaganath R, McGinty D, Szymusiak R. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J Physiol* 2002; **538**:619–631.
10. Koyama Y, Takahashi K, Kodama T, Kayama Y. State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience* 2003; **119**:1209–1219.
11. Debarbieux F, Brunton J, Charpak S. Effect of bicuculline on thalamic activity: a direct blockade of IAHP in reticularis neurons. *J Neurophysiol* 1998; **79**:2911–2918.
12. Alam MN, Kumar S, Bashir T, Suntsova N, Methippara MM, Szymusiak R *et al*. Evidence for GABA mediated control of hypocretin- but not MCH-immunoreactive neurons during sleep in rats. *J Physiol* 2005; **563**:569–582.
13. Stone TW. In: Smith AD (ed.). Methods in the neurosciences. New York: Wiley; 1985.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

14. Torterolo P, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. Hypocretinergic neurons are primarily involved in activation of the somatomotor system. *Sleep* 2003; **26**:25–28.
15. Lee M, Jones BE. Discharge of identified orexin neurons across the sleep–waking cycle. *Neuroscience abs* 2004; **841.1**.
16. Gervasoni D, Darracq L, Fort P, Souliere F, Chouvet G, Luppi PH. Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci* 1998; **10**:964–970.
17. Nitz D, Siegel JM. GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am J Physiol* 1996; **271**:R1707–R1712.
18. Nitz D, Siegel J. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol* 1997; **273**:R451–R455.
19. Nitz D, Siegel JM. GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* 1997; **78**:795–801.
20. Backberg M, Ultenius C, Fritschy JM, Meister B. Cellular localization of GABA receptor alpha subunit immunoreactivity in the rat hypothalamus: relationship with neurones containing orexigenic or anorexigenic peptides. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**:589–604.
21. van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron* 2004; **42**:635–652.
22. Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Grivel J, Machard D, Muhlethaler M *et al*. Opposite effects of noradrenaline and acetylcholine upon hypocretin/orexin versus melanin concentrating hormone neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience* 2005; **130**:807–811.
23. Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1981; **1**:876–886.
24. Gallopin T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J *et al*. Identification of sleep-promoting neurons *in vitro*. *Nature* 2000; **404**:992–995.
25. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhratsky A. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons *in situ*. *J Neurosci* 2005; **25**:2429–2433.

Acknowledgements: R. Goutagny received a doctoral fellowship from the Région Rhône-Alpes. The authors thank J.-C. Comte for his assistance in analysis, L. Dahan and N. Vautrelle for their technical assistance with the head-restrained system.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

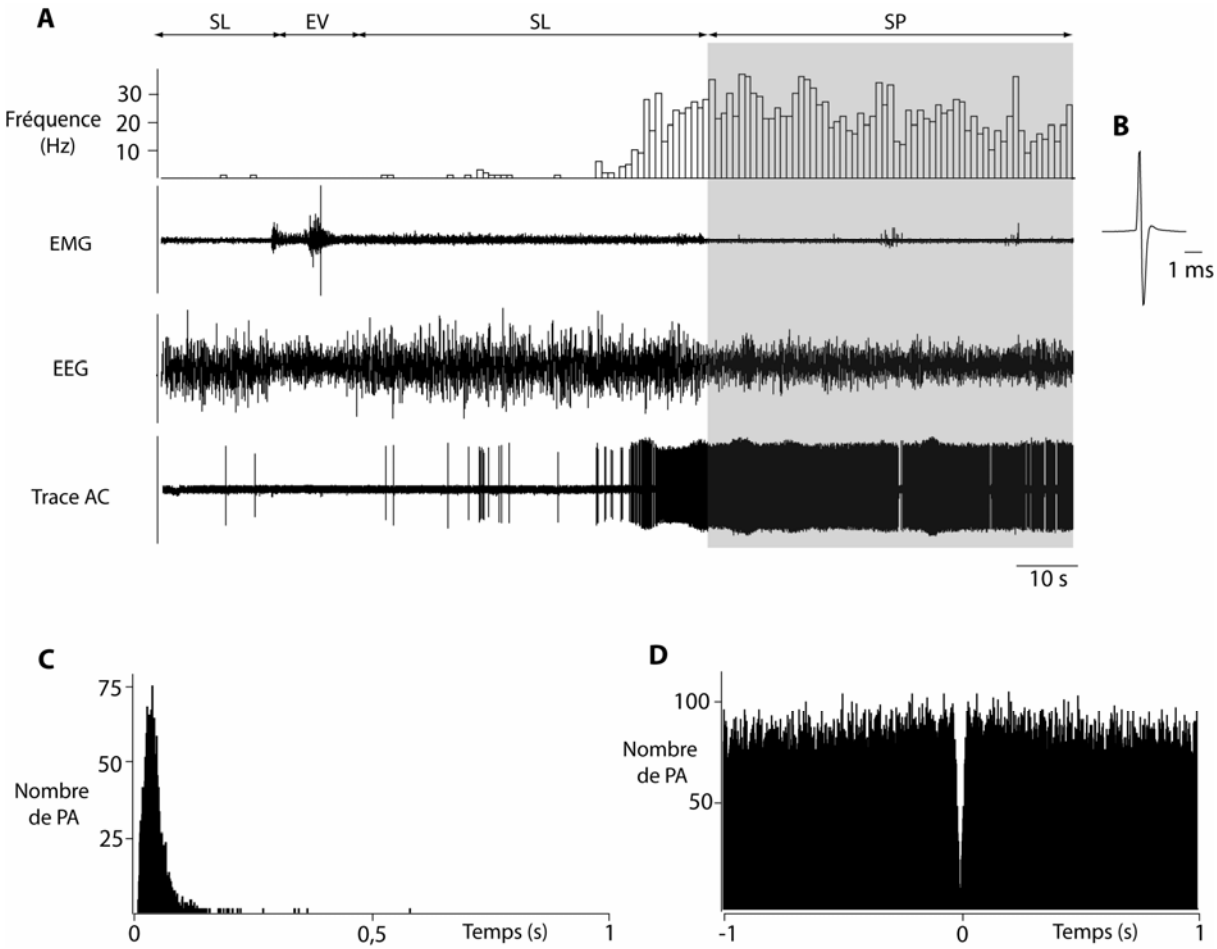


Figure 41: Mode de décharge d'un neurone SP-on de la PF-LHA : **A**- La fréquence de décharge de ce neurone augmente fortement durant le SP. **B**- Forme moyenne du PA de ce neurone SP-on, illustrant le bon rapport signal/bruit de nos enregistrements électrophysiologique. **C**- Graphique d'intervalle d'événements illustrant une décharge rapide (prédominance des intervalles courts). **C**- Auto-corrélogramme durant le SP illustrant l'absence de motif particulier de décharge.
De plus, ce neurone présente une augmentation de sa fréquence de décharge avant le début du SP, et cesse de décharger avant le retour de l'EV.

Compléments sur l'étude électrophysiologique

I. Les neurones SP-on

Tous les neurones que nous avons classés comme SP-on présentent une activité tonique (parfois associée à des bouffées de PA) tout au long du SP.

Ces neurones présentent une activité tonique durant l'éveil et le sommeil lent (respectivement 6,07 PA/sec ± 1 ,6 et 5,5 PA/sec ± 1,4). Au cours du sommeil paradoxal, ces neurones présentent une forte augmentation de leur fréquence de décharge pour atteindre 20,6 PA/sec ± 3,8. Le test ANOVA suivi d'un test *a posteriori* PLSD de Fisher montre une différence significative de la fréquence de décharge entre le SP et les 2 autres stades de vigilance ($p<0,0001$, figure 41). L'utilisation des auto-corrélogrammes et des histogrammes d'intervalles entre PA ne montrent pas de motif particulier de décharge de ces neurones (figure 41).

Les neurones SP-on ne présentent pas tous d'anticipation pour le début ou la fin du SP. Il pourrait donc exister 2 types de neurones SP-on au sein de la PF-LHA. Une de ces populations (n=10/16, figure 41) anticipe le début de la phase de SP et présente une diminution de sa fréquence de décharge avant la fin de cet état de vigilance. Ils correspondent ainsi aux critères décrits par Sakai (1985) et pourraient de ce fait participer activement à la régulation du SP:

A l'inverse, les neurones présentant une augmentation de leur fréquence de décharge après le début de la phase de SP arrêtent de décharger après la fin de cet état (n=6/16, figure 42). Ainsi, leur activation durant le SP semble plutôt être une conséquence de cet état, et non une cause.

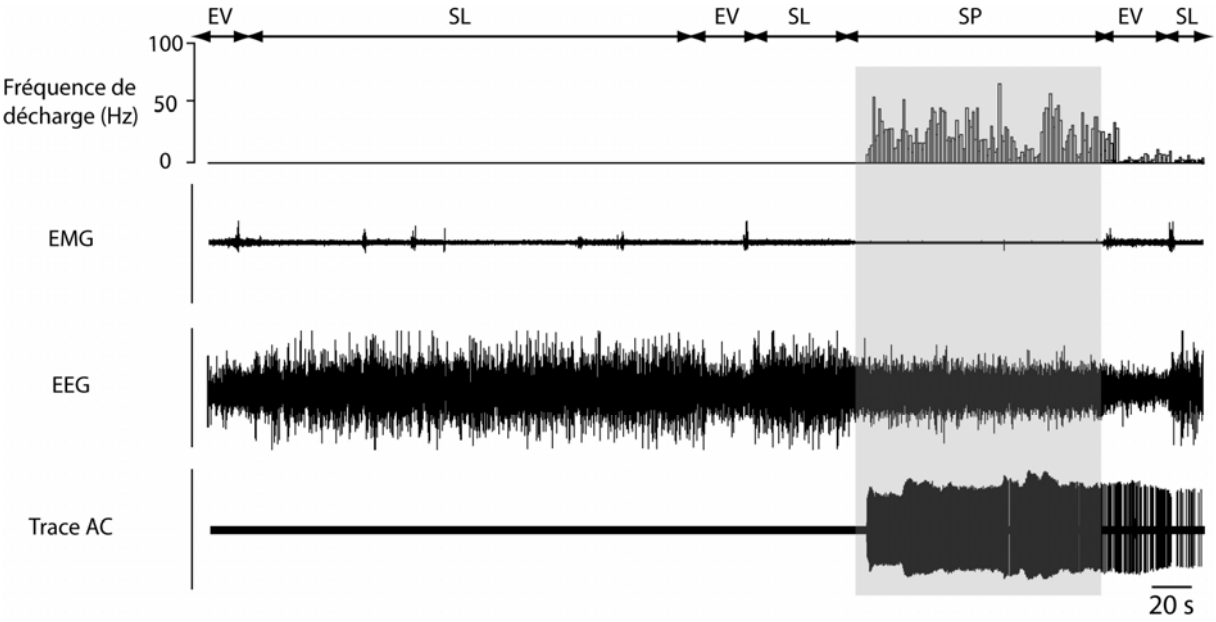


Figure 42: Figure illustrant un neurone SP-on présentant une augmentation de sa fréquence de décharge après le début du SP, et cessant de décharger après le retour de l'EV.

Ainsi, et comme illustré dans la figure 43, il existerait au sein de la PF-LHA au moins 2 types de neurones SP-on, basés sur leur degré d'anticipation vis-à-vis du SP :

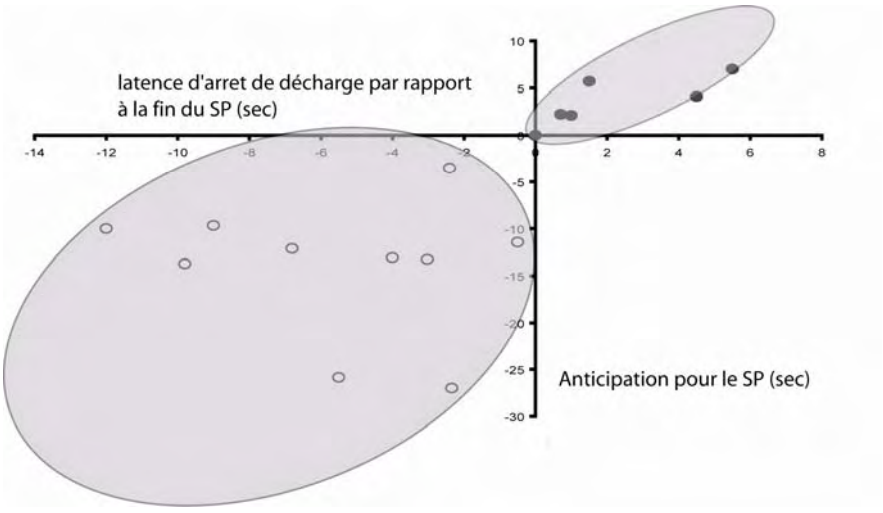


Figure 43 : répartition des neurones SP-on de la PF-LHA selon leur degré d'anticipation pour le début (ordonnée) ou la fin du SP (abscisse). Il est possible de déterminer 2 groupes de neurones SP-on grace à cette représentation.

II. Les neurones EV-on

Les neurones de type EV-on présentent un taux de décharge moyen de 5,2 PA/sec ± 1,7 durant l'EV. Au cours du sommeil lent, leur taux de décharge diminue pour atteindre 1,55 PA/sec ± 1,02. Enfin, ils sont quasiment inactifs durant les épisodes de SP avec une fréquence moyenne de décharge de 0,35 PA/sec ± 0,23. Le test ANOVA suivi d'un test a posteriori PLSD de Fisher montre une différence significative de la fréquence de décharge entre l'EV et les 2 autres stades de vigilance ($p = 0,03$).

La fréquence de décharge de ces neurones est positivement corrélée à l'amplitude rectifiée de l'EMG ($r = 0,48$, $t = 5,96$, $p < 0,0001$, figure 44).

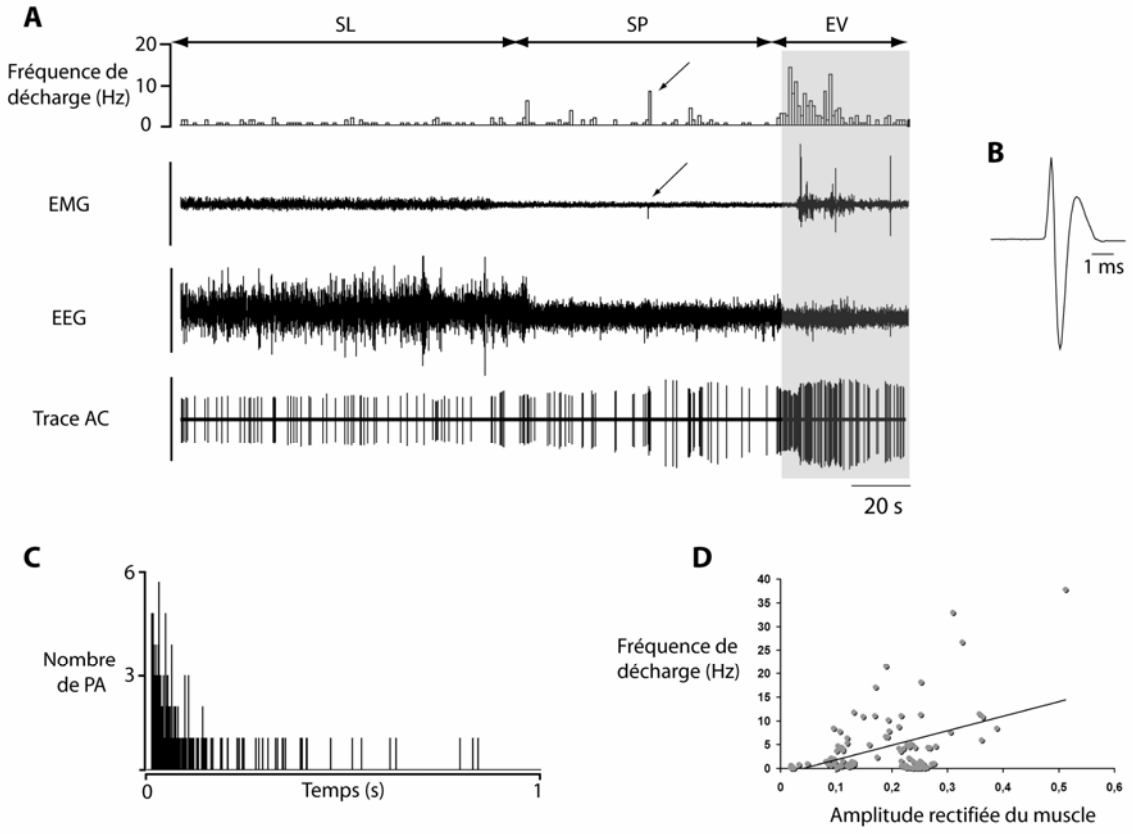


Figure 44 Mode de décharge d'un neurone EV-on de la PF-LHA: **A-** La fréquence de décharge de ce neurone augmente fortement durant l'EV. **B-** Forme moyenne du PA de ce neurone EV-on. **C-** Graphique d'intervalle d'événements illustrant illustrant une décharge où prédomine les intervalles courts (décharge avec des bouffées phasiques corréles aux mouvements) **D-** Forte corrélation entre la fréquence de décharge de ces neurones EV-on et l'amplitude rectifiée du muscle.

III. Les neurones EV-SP

Les neurones de type EV-SP présentent un taux de décharge moyen comparable durant l'EV et le SP (4,64 ± 0,98 Hz et 5,32 ± 1,37 Hz respectivement). Au cours du SL, ces neurones présentent une diminution de leur fréquence de décharge pour atteindre 2,92 ± 0,76 Hz. Le test ANOVA suivi d'un test à posteriori PLSD de Fisher montre une différence significative de la fréquence de décharge entre le SL et les 2 autres stades de vigilance (p = 0,04, figure 45).

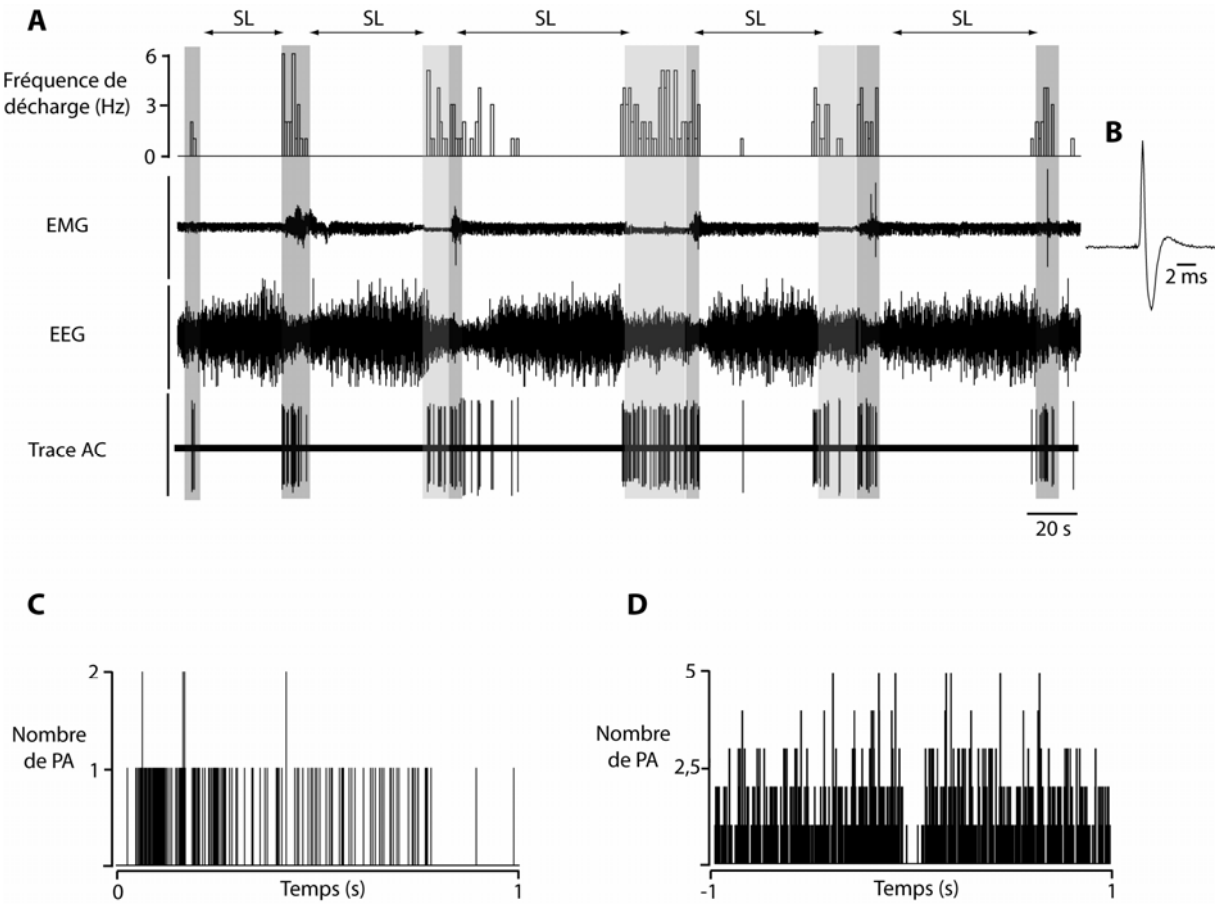


Figure 45 Mode de décharge d'un neurone EV-SP de la PF-LHA: **A-** Ce neurone est actif uniquement durant les épisodes d'EV (rectangles foncés) et de SP (rectangles clairs) et inactif durant le SL. **B-** Forme moyenne du PA de ce neurone EV-SP. **C et D-** histogramme d'intervalle d'événements et auto-corrélogramme illustrant l'absence de motif particulier de décharge

V. Représentation de l'ensemble des neurones enregistrés

Nous avons enregistré 36 neurones de la PF-LHA au cours des 3 états de vigilance. Parmi ceux-ci, 32 présentaient une fréquence de décharge corrélée aux états de vigilance:

	Fréquence de décharge (Hz)			Durée moyenne des PA (msec)
	EV	**SL**	**SP**	
Neurones SP-on (n=22)	6,07 ± 1,6	5,5 ± 1,4	20,6 ± 3,8 ***/°°°	2,43 ± 0,19
Neurones EV-on (n=6)	5,2 ± 1,7 */#	1,55 ± 1,02	0,35 ± 0,23	2,76 ± 0,23
Neurones EV-SP (n=4)	4,64 ± 0,98 #	2,92 ± 0,76	5,32 ± 1,37 °	2,39 ± 0,29

Tableau 4: Fréquence de décharge et durée des PA des différents types de neurones enregistrés au sein de la PF-LHA. * différence significative entre le SP et l'EV ° entre le SP et le SL et #entre l'EV et le SL. Test de *t* apparié (***: p<0,0001; °°°: p<0,0001; *: p<0,05; #: p<0,05 and °: p<0,05).

En collaboration avec Jean-Christophe Comte, physicien au laboratoire, nous avons développé une méthode de représentation simple de l'ensemble des neurones enregistrés au sein de la PF-LHA. Pour ce faire, nous avons utilisé une représentation vectorielle en trois dimensions des neurones enregistrés (figure 46).

Ainsi, chaque vecteur est est défini par 3 coordonnées correspondant à chaque état de vigilance et calculéés selon la formule suivante : $Vector = \frac{Discharge\ Frequency\ of\ the\ considered\ State}{\sqrt{\Sigma Frequencies^2}}$

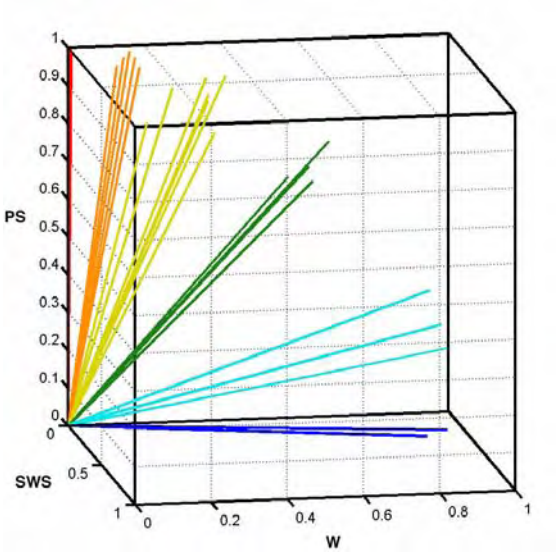


Figure 46: représentation vectorielle des neurones enregistrés dans l'HP

Chaque vecteur « code » la spécificité d'un neurone pour un état de vigilance donné. Les neurones de types SP-on se retrouveront donc attirés par l'axe représentant le SP (les vecteurs rouges, orange et jaunes représentent ainsi les neurones de type SP-on), les vecteurs représentant les neurones EV-on seront eux dirigés vers l'axe EV (vecteurs bleus).

Cette représentation permet donc d'apprécier la sélectivité des neurones de l'HP pour les différents états de vigilance.

Compléments sur l'étude pharmacologique

Grâce à l'utilisation des pipettes multicanaux, nous pouvons injecter des traceurs neuroanatomiques au niveau des sites d'enregistrements des neurones SP-on et des sites pharmacologiquement actifs (sites où l'éjection de bicuculline induit une modification des états de vigilance).

Il est ainsi possible, *a posteriori*, de cartographier précisément les différents sites d'injection (figure 47):

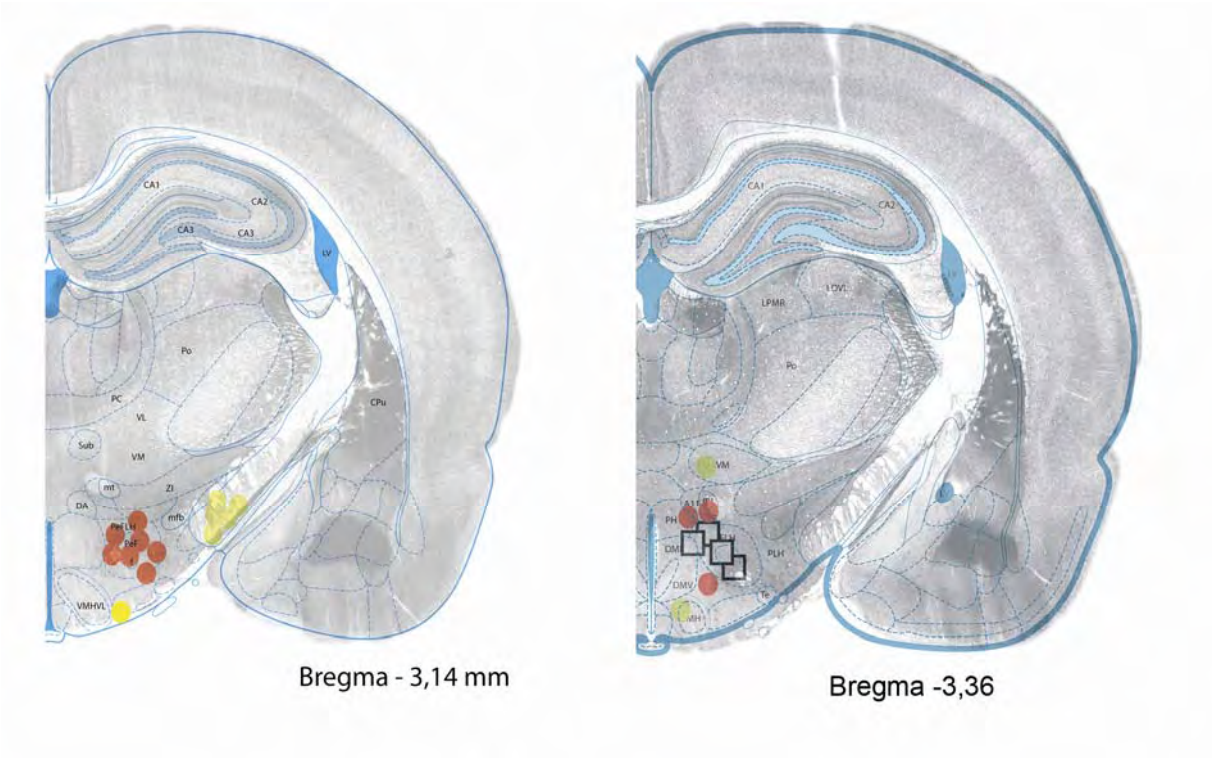


Figure 47: Localisation des sites d'éjection replacés sur un diagramme de cerveau de rat. Cercles rouges : sites actifs de bicuculline; carrés ouverts: sites actifs de gabazine et cercles jaunes: sites inactifs de bicuculline.
Abbréviations : **CA1, CA2 et CA3** : hippocampe. **CL, PO, PC, VL, VM** et Sub: noyaux du thalamus. **mt** : faisceau mammillothalamique. **DA** : hypothalamus dorsal. **PeFLH, PeF et f** : fornix et région périfornicale de l'hypothalamus. **CPu** : noyau caudé putamen. **VMH** : hypothalamus ventro –médian. **DMD et DMV** : hypothalamus dorso –médian. **ZI** : zona incerta.

Ainsi, les éjections de bicuculline localisées dorsalement, ventralement ou latéralement par rapport à la zone périfornicale/zone latérale hypothalamique n'induisent aucune modification des états de vigilance.

Le dernier jour d'expérimentation, nous procédons à une injection de bicuculline de longue durée afin de mettre en évidence, par immunohistochimie de la protéine Fos, les neurones activés suite à l'injection pharmacologique (figure 48) mais aussi la taille des sites d'injection. Ainsi, nous avons observé que l'injection d'un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ induit une forte excitation des neurones Hcrt (28% des neurones Hcrt sont immuno-réactifs au Fos) alors qu'elle n'a aucun effet sur les neurones MCH (3% seulement des neurones MCH sont doublement marqués pour le Fos):

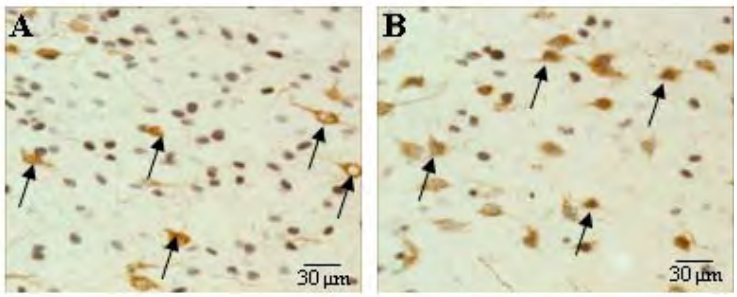


Figure 48 : Photographies illustrants un double marquage C-Fos/MCH (A) et C-Fos/Hcrt (B) chez un rat ayant reçu une injection de 90 min de bicuculline.
A- Notez la présence de nombreux neurones MCH (flèches) non-marqués pour le C-Fos.
B- Notez la présence de nombreux neurones doublement marqués Hcrt/C-Fos (flèches).

Mise au point du marquage juxtacellulaire

A la vue des premiers résultats électrophysiologiques, il nous a semblé important de pouvoir caractériser le mode de décharge de neurones identifiés comme MCH. Pour ce faire, la méthode de marquage juxtacellulaire développée par Pinault (Pinault 1996) nous a paru la plus appropriée. Elle permet en effet, grâce à l'éjection juxtacellulaire de neurobiotine (par des pas de courant de faible intensité) de marquer unitairement un neurone préalablement caractérisé électrophysiologiquement. Pour ce faire, l'électrode doit être approchée au contact de la membrane du corps cellulaire et la configuration juxtacellulaire doit être maintenue durant au moins 5 minutes afin d'obtenir un marquage correct du neurone (la validité du marquage n'étant visible que post-mortem). Suite à ce marquage juxtacellulaire, il est possible d'effectuer des doubles marquages immuno-histochimiques afin de déterminer la nature neurochimique du neurone marqué.
Cependant, avant d'utiliser cette technique sur le rat vigile en contention, nous l'avons mise au point sur l'animal anesthésié.

I. Mise en œuvre

Les potentiels d'action extracellulaires (PA) sont enregistrés à l'aide de micro-électrodes de verre avec filament et emplies d'une solution de chlorure de sodium 0,5M contenant 4% de neurobiotine. L'impédance mesurée en courant continu et à 10 Hz est de 30 à 60 mégohms. La référence électrique (potentiel zéro) est constituée d'un fil d'argent chloruré placé dans une solution de chlorure de sodium à 0,9%.
L'électrode d'enregistrement est descendue dans le cerveau par paliers successifs à l'aide d'un micro-descendeur piézo-electrique. Le signal recueilli est amplifié (amplificateur intracellulaire Axoclamp 2B) et filtré (bande passante 0,5-10kHz). Quand un neurone a été enregistré et caractérisé en extracellulaire, la neurobiotine est éjectée sous contrôle électrophysiologique afin de s'assurer que le neurone reste vivant selon la technique préalablement mise au point (Pinault, 1996). Le traceur est éjecté grâce à des créneaux de courant d'intensité faible (200 msec ON, 200 msec OFF, 1 à 20 nA). Après quelques minutes d'éjection, l'activité électrique du neurone change, indiquant un passage en juxtacellulaire. En effet, le neurone présente une augmentation significative de sa fréquence de décharge durant les 200 ms ON d'éjection alors qu'il retrouve sa fréquence basale durant les 200 msec OFF.

II. Résultats sur l’animal anesthésié

Nous avons testé ce type de marquage sur 11 rats anesthésiés. Afin de se rapprocher le plus rapidement possible des conditions d’enregistrements du rat vigile, nous avons testé ce protocole de marquage directement sur les neurones hypothalamiques d’intérêt. Néanmoins, ceci s’est avéré très problématique du fait de la très faible activité électrophysiologique de cette région cérébrale chez l’animal anesthésié, montrant à nouveau l’intérêt de s’affranchir le plus souvent possible de l’anesthésie. Nous avons donc décidé de mettre au point cette technique sur des neurones du thalamus et de l’hippocampe, connus pour être moins inhibés chez le rat anesthésié (figure 49). Nous avons ainsi pu valider le protocole d’injection en réussissant le marquage de 3 neurones thalamiques et d’un neurone hippocampique :

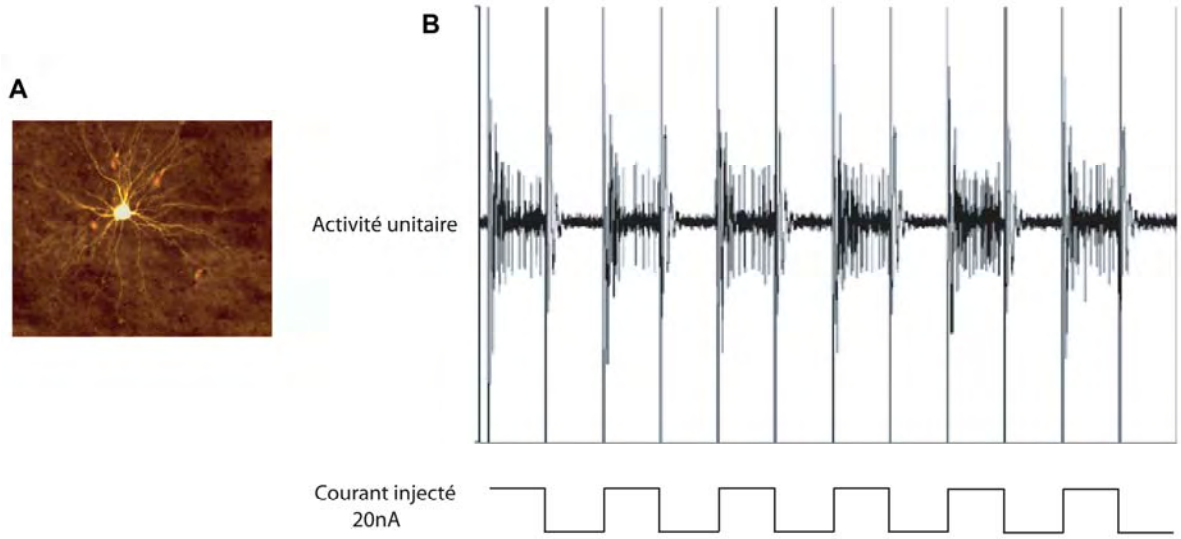


Figure 49 A- Marquage juxtacellulaire d’un neurone thalamique suite à l’éjection iontophorétique de neurobiotine.

B- Réponse unitaire du neurone lors de l’éjection de la neurobiotine. Notez l’activation du neurone lors des pas de créneaux positifs (courant injecté : 20nA) témoignant le passage en configuration juxtacellulaire.

III. Résultats sur l’animal vigile

Aux vues des difficultés expérimentales rencontrées, nous n’avons réussi à marquer de façon satisfaisante qu’un seul neurone par la technique en juxtacellulaire sur le rat vigile en contention (n=6). En effet, avant de procéder au marquage juxtacellulaire d’un neurone, il

convient de caractériser son activité électrophysiologique au cours des 3 états de vigilance. De plus, afin de pouvoir corréler l'activité électrophysiologique du neurone enregistré à sa nature neurochimique, un seul neurone peut-être marqué par animal. L'animal doit donc être sacrifié 3 heures après le marquage présumé du neurone.

Le neurone que nous avons unitairement marqué, bien qu'actif durant l'EV et le SL, présentait une augmentation de sa fréquence moyenne de décharge durant les phases de SP. Cette augmentation de fréquence survenait après le début de l'épisode de SP proprement dit. Ce neurone correspondait donc aux neurones dont l'activation durant le SP semble être une conséquence plus qu'une cause de cet état.

Par un double marquage Neurobiotine/MCH en fluorescence, et bien que le corps cellulaire du neurone n'ait pu être localisé, nous avons pu conclure à posteriori que ce neurone ne contenait pas de MCH (figure 50). En effet, des troncs dendritiques, d'où partent les dendrites proximaux, marqués à la neurobiotine, ont été retrouvés, confirmant le marquage unitaire du neurone. Ces prolongements dendritiques n'ont en revanche pas démontré de marquage à la MCH, mis en évidence par immunohistochimie, indiquant que le neurone enregistré n'était donc pas de nature MCH-ergique.

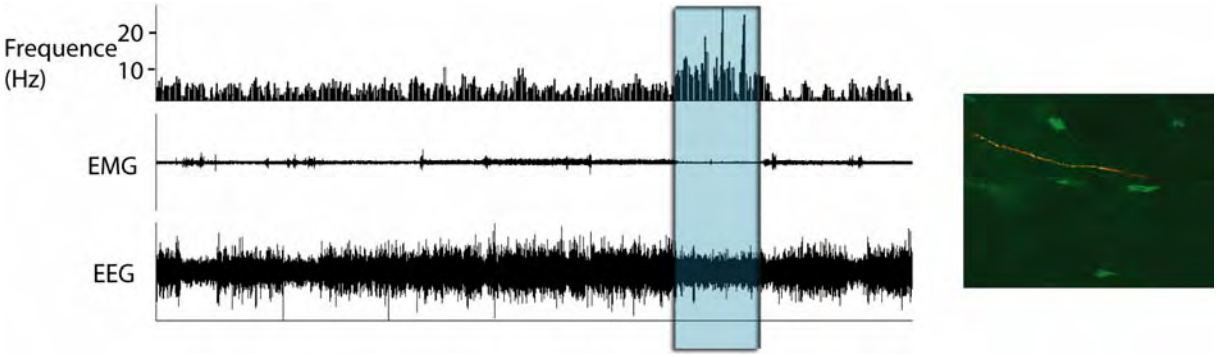


Figure 50: Activité électrophysiologique d'un neurone plus actif en SP que durant les 2 autres états.
Photographie représentant une fibre de ce neurone marqué à la neurobiotine (en orange) entouré de neurones MCH (en vert). La fibre marquée n'étant pas double, le neurone n'est donc pas de type MCH.

Discussion et conclusion

I. Données électrophysiologiques

A – Les neurones EV-on

Nous avons mis en évidence, dans l'hypothalamus postérieur, des neurones dont l'activité est corrélée à la survenue des épisodes d'EV. Ces neurones, bien que quasiment inactifs durant le SP, présentent des bouffées d'activités associées aux mouvements phasiques survenant durant cet état de vigilance. Nous avions émis l'hypothèse, en accord avec les données de neuroanatomie fonctionnelle (Estabrooke et coll., 2001), que ces neurones pouvaient correspondre aux neurones à hypocrétine de l'HP.

Depuis la publication de notre étude, 2 groupes ont réussi à enregistrer l'activité électrophysiologique au cours du cycle-sommeil de neurones identifiés comme hypocrétinergiques (Lee et coll., 2005; Mileykovskiy et coll., 2005). Chez le rat vigile en contention, les neurones à hypocrétine déchargent durant l'EV, diminuent d'activité durant le SL pour devenir inactifs durant le SP (Lee et coll., 2005). De plus, l'activité de ces neurones est corrélée à l'amplitude de l'EMG. Ils pourraient de ce fait correspondre aux neurones EV-on enregistrés au cours de notre étude.

Chez le rat libre de se mouvoir, les neurones à hypocrétine présentent de plus une activation lors de la présentation d'un stimulus externe (déclenchement d'un son…), lors de comportements exploratoires, de la prise de nourriture…. . Bien que pouvant être associés à une activité musculaire importante, les épisodes de toilettages et de consommation de nourriture sont caractérisés par une décharge moindre de ces neurones (Mileykovskiy et coll., 2005).

Les neurones à hypocrétine ne seraient donc pas uniquement impliqués dans la régulation de l'EV actif, ils participeraient également à la régulation de comportements motivés et/ou émotionnels.

B – Les neurones SP-on

Nous avons mis en évidence, en accord avec les études antérieures (Sakai et coll., 1990; Alam et coll., 2002; Koyama et coll., 2003), des neurones présentant une activité corrélée à la survenue des épisodes de SP au sein de la PF-LHA.

Selon Sakai (Sakai 1985), les neurones SP-on impliqués dans la genèse du SP doivent répondre à 3 critères principaux :

- Ils doivent présenter une augmentation de leur fréquence de décharge avant le début proprement dit du SP.
- Leur décharge doit être tonique tout au long de l'épisode de SP.
- Ces neurones doivent cesser de décharger avant l'apparition de l'EV suivant l'épisode de SP.

Nous avons enregistrés, en accord avec les études antérieures (Koyama et coll., 2003) dans la PF-LHA des neurones SP-on dont l'augmentation de l'activité électrophysiologique anticipe l'apparition des signes polysomnographiques du SP. De plus, ces neurones présentent une diminution de leur fréquence de décharge quelques secondes avant la fin de l'épisode de SP proprement dit. Ainsi, et contrairement aux hypothèses actuelles, l'hypothalamus postérieur contient des neurones dont l'activité électrophysiologique est compatible avec un rôle actif de cette région dans régulation du SP.

Ces neurones SP-on sont-ils, comme le suggèrent nos résultats de neuroanatomie fonctionnelle (Cf. Chapitre 2), de nature MCHergique ? Nos données pharmacologiques indiquent que les neurones MCH ne sont pas actifs durant l'EV. Ainsi, les neurones MCH ne semble pas correspondres aux neurones EV-on ni aux neurones actifs durant l'EV et le SP.

De plus, nos résultats juxtacellulaires, bien que préliminaires, montrent que les neurones SP-on ne présentant pas d'anticipation pour le SP ne sont pas de nature MCHergique.

Nous faisons ainsi l'hypothèse que les neurones SP-on anticipant le début des phases de SP correspondraient aux neurones MCH.

Afin de confirmer cette hypothèse, la caractérisation juxtacellulaire des neurones SP-on de la PF-LHA semble la technique la plus appropriée.

II. Données pharmacologiques

Nous avons démontré que le blocage local, au sein de la PF-LHA, de la transmission GABAergique induit un état d'éveil ininterrompu associé à une forte augmentation du tonus musculaire. Une analyse plus fine du signal EEG indique que l'état pharmacologiquement induit correspond en fait à un état dissocié avec l'activité EEG d'un EV calme associé à un tonus musculaire d'EV actif. Ainsi, et contrairement à notre hypothèse de départ, nous n'obtenons pas d'hypersomnie mais à l'inverse un blocage complet du sommeil (SL et SP).
Afin de mettre en évidence les populations neuronales activées par le blocage de la transmission GABAergique, et ainsi vérifier l'activation des neurones MCH, nous avons effectué des injections longues (90 min) de bicuculline ou de Gabazine au sein de la PF-LHA.

En accord avec leur inactivité supposée durant l'éveil, nous avons observé qu'un très faible nombre de neurones MCH était doublement marqués avec le C-Fos suite à l'éjection d'antagoniste GABAergique dans la PF-LHA. Par ailleurs, l'absence de marquage C-Fos suggère l'absence d'une inhibition GABAergique sur ces neurones. Ces résultats restent surprenants car les neurones à MCH expriment des récepteurs de type $GABA_A$ et sont hyperpolarisés par le muscimol (agoniste $GABA_A$) *in-vitro* (Backberg et coll. 2004; van den Pol et coll. 2004).
Les neurones à MCH pourraient alors être préférentiellement contrôlés par des neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'EV. En soutien de cette hypothèse, Van den Pol et Coll., (2004) ont montré que la noradrénaline et la sérotonine inhibent directement les neurones MCH enregistrés *in-vitro.* Or les neurones monoaminergiques sont actifs durant l'EV, et diminuent progressivement leur fréquence de décharge durant le SL pour devenir inactifs durant le SP (Aston-Jones et Bloom 1981; Lydic et coll., 1987). La diminution progressive des arrivées monoaminergiques durant le sommeil pourrait ainsi faciliter l'activation des neurones à MCH, à l'instar de ce qui se passe au niveau des neurones du VLPO. Afin de valider cette hypothèse, il est crucial de comprendre la régulation des neurones SP-on de la PF-LHA au cours du cycle veille sommeil. Il faudrait pour ce faire procéder à une étude de pharmacologie unitaire sur le modèle du rat vigile en contention, avec une attention particulière pour les neurotransmettteurs de l'EV et leurs antagonistes respectifs, ainsi que pour le GABA et ses antagonistes (bicuculline ou gabazine). Ainsi, les neurones SP-on de la PF-LHA anticipant le SP (et possiblement de nature MCHergique) devraient être

excités par les antagonistes des neurotransmetteurs de l'EV et ne pas présenter de réponse à la bicuculline ou à la gabazine.
Le blocage complet du sommeil que nous obtenons est également associé à une forte augmentation du marquage C-Fos au sein des neurones à Hcrt comparativement à l'éjection contrôle de NaCl (28% de neurones doublement marqués vs 0%).
Ainsi, nos données et celles préalablement rapportées, tant au niveau pharmacologique (Alam et coll. 2005) qu'électrophysiologique (Lee et coll., 2005; Mileykovskiy et coll., 2005) indiquent que les neurones à hypocrétine sont inactifs durant le sommeil (SL et SP). De plus, ils seraient sous un contrôle inhibiteur GABAergique durant le SL et le SP à l'image de ce qui a été démontré auparavant pour les autres systèmes d'EV (Nitz et Siegel 1996; Nitz et Siegel 1997; Nitz et Siegel 1997; Gervasoni et coll., 1998; Gervasoni et coll., 2000). Il existerait ainsi un mécanisme commun d'inhibition des systèmes d'EV durant le SP.

L'effet éveillant et suppresseur du sommeil obtenu suite à l'injection iontophorétique de bicuculline au sein de la PF-LHA n'est pas dû à la seule activation des neurones Hcrt. En effet, les neurones Fos+/Hcrt+ ne représentent que 7% de l'ensemble des neurones Fos+ observé dans la PF-LHA. Il existerait donc, au sein de la PF-LHA, d'autres types neuronaux inhibés par le GABA et actifs durant l'EV. Les études électrophysiologiques ont mis en évidence deux types de neurones actifs durant l'EV: les neurones EV-on, qui comme nous l'avons vu précédemment, seraient en partie de nature hypocrétinergiques et des neurones présentant une activation durant les phases d'EV et de SP (neurones EV-SP) qui ne seraient pas de nature MCHergique (Steininger et coll., 1999; Koyama et coll., 2003). Cependant, et même si le rôle et la nature neurochimique de cette dernière classe de neurones ne sont pas connus à ce jour, ils pourraient participer à la modulation des activités corticales de l'EV et du SP (rythmes thêta et gamma). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'hypothalamus postérieur, via des projections sur le septum médian, participe à la régulation du rythme thêta hippocampique, que ce soit au niveau de sa fréquence ou de son amplitude (revue dans (Kirk 1998)).

En conclusion, nos données confirment que l'HP contient des neurones présentant une activité électrophysiologique corrélée à la survenue des épisodes de SP. De plus, les neurones à MCH ne sont pas inhibés par le GABA durant l'EV et le SL, et seraient plutôt inhibés par les neurotransmetteurs de l'EV (NA et 5-HT).

L’ensemble de ces données est ainsi compatible avec le rôle supposé des neurones à MCH dans la régulation du sommeil.

Chapitre 4 :

Rôle du noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal dans la régulation du sommeil paradoxal

Introduction

Il est admis depuis de nombreuses années qu'une étape cruciale du processus de genèse et du maintien du SP est l'arrêt de l'activité de l'ensemble des systèmes d'éveil disséminés dans le SNC, essentiellement les systèmes monoaminergiques comme les neurones noradrénergiques (NA) du locus coeruleus (LC), sérotoninergiques des noyaux du raphé (NRD) et histaminergiques du noyau tubéromamillaire (TMN) de l'hypothalamus (voir revue (Sakai 1988).

Parmi ceux-ci, le noyau du locus coeruleus (LC) joue un rôle prédominant dans la genèse et le maintien de l'éveil cortical, à travers ses neurones NA et leurs projections vers l'ensemble du névraxe (revue (Jouvet 1972). De par son statut de centre de l'éveil, le LC exercerait un contrôle inhibiteur vis à vis des centres de genèse du SP. Une étape expérimentale fondamentale à l'origine de cette hypothèse a été la caractérisation de l'activité électrophysiologique des neurones du LC qui démontrent une décharge tonique pendant l'éveil, une diminution progressive pendant le SL jusqu'à une cessation d'activité pendant le SP (SP-off (Hobson et coll. 1975). De plus, il a été enregistré au sein du tegmentum pontique dorsal des neurones dont l'activité unitaire est strictement inverse de celle des neurones SP-off du LC, déchargeant uniquement pendant les épisodes de SP (en conséquence neurones de type SP-on). Ces neurones SP-on, dits exécutifs du SP, sont représentés par les neurones cholinergiques des noyaux tegmental latérodorsal (LDT), tegmental pédonculopontin (PPT) et non-cholinergiques du noyau péri-locus coeruleus (périLCα) chez le chat (équivalent du noyau sublatéro-dorsal du rat, SLD) (revue (Sakai et coll., 1981). L'existence de ces deux populations de neurones à proximité l'une de l'autre a conduit à l'élaboration de divers modèles d'interaction réciproques selon lesquels les neurones NA du LC seraient inhibiteurs vis à vis du SP et qu'en conséquence leur inactivation serait une étape nécessaire à l'apparition du SP (McCarley et Hobson 1975; Sakai et coll., 1981). Ainsi, les neurones SP-off s'arrêteraient sous l'influence inhibitrice indirecte des neurones cholinergiques SP-on, via l'excitation d'interneurones GABAergiques et/ou glycinergiques (Fort et coll., 1990; Jones 1991; Luppi et coll. 1991; Fort et coll. 1993; Rampon et coll., 1996), permettant ainsi l'entrée en SP. Cette hypothèse a été confirmée grâce à la mise en œuvre d'une préparation expérimentale originale chez le rat vigile. En effet, il a pu être démontré que l'inactivation des neurones monoaminergiques du LC et du NRD au cours du SP est due à une augmentation

spécifique à cet état de sommeil de la libération de GABA (Gervasoni et coll., 1998; Gervasoni et coll., 2000).

D'après les études anatomiques d'Aston-Jones et coll., (1986), les deux afférences principales au LC sont situées dans le bulbe rachidien. L'une excitatrice est représentée par le noyau réticulé latéral paragigantocellulaire (LPGi), et l'autre, inhibitrice, serait le noyau réticulé dorsal paragigantocellulaire (DPGi).

Cependant, à l'aide d'injections restreintes au LC d'un traceur rétrograde performant (sous-unité b de la toxine cholérique, CTb), Luppi et coll. (1995) ont montré chez le rat un grand nombre de structures afférentes au LC. Elles incluent principalement les noyaux réticulés paragigantocellulaires latéral et dorsal (LPGi et DPGi) dans le bulbe rachidien et le noyau Kölliker-Fuse (KF), la substance grise périaqueducale ventrolatérale (vlPAG) et dorsale (dPAG) dans le pont. Dans la partie antérieure du cerveau, des populations importantes de neurones rétrogradement marqués ont été détectées dans les aires hypothalamiques postérieure (PH) et latérale (LH), l'aire préoptique latérale (LPO), plus particulièrement le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO). Finalement, une projection directe émanant du cortex préfrontal a été mise en évidence. Ceci suggère une grande complexité du contrôle du LC du fait de la multiplicité de ses afférences.

D'après les expérimentations de Jouvet et coll. (1962), les neurones suffisants pour la genèse du SP sont restreints au tronc cérébral inférieur. Par une technique de traçage rétrograde de voies nerveuses couplée à l'immunohistochimie de la GAD, l'enzyme de synthèse du GABA, il a été montré que seulement deux structures ponto-bulbaires, le DPGi et la vlPAG contribuent à l'innervation GABAergique du LC (Luppi et coll., 1999).

Afin de circonscrire celles mises en jeu spécifiquement pendant le SP, Verret et coll (2006) ont induit une forte hypersomnie en SP chez des rats grâce à la méthode de la piscine. En couplant l'immunohistochimie du marqueur de l'activité neuronale c-Fos à l'injection de CTb dans le LC, ils ont pu observés un grand nombre de neurones doublement marqués spécifiquement après une hypersomnie en SP dans trois structures : le DPGi et à un degré moindre la vlPAG et le LPGi. Ainsi, les neurones du DPGi afférents au LC semblent être actifs au cours du SP. De plus, il semblerait que ces neurones soient de type GABAergique. En effet, Ennis et Aston-Jones (1989) ont montré que la stimulation électrique du DPGi induisait une inhibition des neurones du LC inversée par l'application locale de bicuculline.

Plus récemment, il a également été mis en évidence qu'une stimulation électrique de longue durée de cette région provoquait une augmentation des quantités de sommeil paradoxal, augmentation abolie par l'administration d'un antagoniste GABAergique dans le LC. Cette

augmentation des quantités de SP est due à une augmentation de la durée des épisodes, suggérant un rôle de cette région bulbaire dans le maintien de cet état (Kaur et coll. 2001).
Cette structure du bulbe rachidien est également impliquée, au même titre que le noyau Prepositus hypoglossi (Pr) dans les phénomènes de coordination visuo-motrice et d'oculomotricité (Spencer et coll. 1989) indiquant qu'elle pourrait jouer un rôle dans les mouvements rapides des yeux observés au cours des phases de SP.
En conclusion, le DPGi pourrait être une structure centrale au sein du réseau neuronal inhibant le LC durant le SP.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse chez le rat par une approche expérimentale pluridisciplinaire:
1) Electrophysiologique: en établissant l'existence dans ce noyau de neurones SP-on, c'est à dire démontrant une augmentation très importante de leur activité unitaire juste avant et durant une phase de SP. De plus, nous vérifierons si la décharge de ces neurones est corrélée aux mouvements oculaires de manière à définir leur implication dans les mouvements rapides des yeux observés durant le SP.
2) Neuroanatomique: en replaçant le DPGi au sein des réseaux neuronaux contrôlant le cycle veille-sommeil. Seront particulierement étudiés les liens neuronanatomiques entre le DPGi, les systèmes d'éveil classiques et les structures exécutives du SP connues telles que le SLD et le DpMe. Deux traceurs conventionnels seront utilisés, le fluorogold (traceur rétrograde qui permet d'étudier les projections afférentes au DPGi) et la leucoagglutinine du Phaseolus (PHA-L, traceur antérograde qui permet de déterminer les sites de projections des neurones du DPGi) chez des rats privés sélectivement de SP durant 72h ou autorisés à récupérer suite à cette privation.

Analyse des résultats électrophysiologiques

Seuls les neurones enregistrés pendant les trois états de vigilance ont été analysés et considérés dans notre étude

Les fréquences moyennes de décharge sont mesurées en temps différé pendant des épisodes d'EV, de SL et de SP à l'aide du logiciel d'analyse Spike 2 et comparées en utilisant un test ANOVA suivi d'un test a posteriori PLSD de Fisher.

Les modes de décharge des neurones du DPGi sont appréciés à l'aide :

- Des histogrammes d'intervalles entre PA (ISI), qui représentent la distribution des intervalles entre les PA successifs. De plus, pour chaque état de vigilance, un index d'asymétrie a été calculé. Cet index d'asymétrie est défini par le rapport entre le mode (correspondant à l'intervalle inter-PA le plus souvent rencontré) et la moyenne de la distribution de l'ISI (correspondant à l'inverse de la fréquence moyenne de décharge). Ainsi, un index d'asymétrie proche de 1 correspond à un mode de décharge régulier alors qu'un index d'asymétrie proche de 0, correspond à un mode de décharge irrégulier (Urbain et coll. 2000). De plus, un coefficient de variation (CV, déterminé par le rapport de la déviation standard de l'ISI sur la moyenne des intervalles inter-PA) des intervalles entre PA a également été calculé pour chaque état de vigilance. Ainsi, plus le CV est élevé, plus le neurone considéré présente un mode de décharge phasique (Koyama et coll., 2003).

- Des autocorrélogrammes d'intervalles entre potentiels d'action. Les ACs tiennent compte de l'organisation temporelle des PA successifs et constituent une méthode standard utilisée pour détecter des périodicités ou des singularités au sein d'un train de PA (Pernier et Gerin 1975).

Enfin pour les neurones SP-on enregistrés lors des transitions SL-SP, nous avons déterminé leur degré d'anticipation par rapport au changement d'état. Pour chacun de ces neurones, nous avons sélectionné un intervalle centré sur le début de la phase de SP identifié visuellement par la présence simultanée d'un EEG désynchronisé et d'une atonie musculaire. De -30 sec à +30 sec autour du début de la phase de SP, le nombre de PA a été mesuré par seconde puis divisé par le nombre total de PA dans l'intervalle (fréquence de décharge normalisée). Une moyenne de référence et un écart-type ont ensuite été calculés sur la période de -30 à -20 sec. Le début d'activation d'un neurone a alors pu être défini comme l'instant où la fréquence de décharge normalisée dépassait sa fréquence de référence de plus de 2 écarts-types pendant au moins 3

sec. Pour la représentation de l'ensemble de la population (figure 53), nous avons ensuite aligné tous les intervalles sur le début des phases de SP et calculé par seconde la moyenne et l'écart-type de la fréquence normalisée.

Les données numériques sont fournies sous la forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne et la significativité des tests statistiques a été fixée à $P \leq 0,05$.

Résultats expérimentaux

I. Electrophysiologie

A - Mise en place de l'enregistrement électrophysiologique du DPGi

Le DPGi s'est avéré difficile à localiser au cours des expérimentations pilotes du fait à la fois de l'absence de données dans la littérature sur les propriétés électrophysiologiques de ses neurones et de sa petite taille. Nous avons donc été amené à explorer électrophysiologiquement la région du DPGi incluant les structures adjacentes dans un rayon de 1 mm. Ainsi, les neurones du DPGi se localisent 1 mm plus ventralement que le dernier neurone présentant une activité typique du cervelet. La limite ventrale du DPGi est constituée par des neurones présentant des potentiels d'action (PA) de grande amplitude, déchargeant à haute fréquence durant les épisodes de SP et les phases d'éveil actif. Après contrôle histologique, il apparaît que ces neurones sont dans le noyau gigantocellulaire (Gi). Nous avons également déterminé la limite caudale du DPGi. Lors de descentes 500 μm plus caudales que les coordonnées stéréotaxiques théoriques du DPGi, nous avons enregistré des neurones présentant une activité corrélée aux mouvements de la mâchoire et à la respiration. Ces neurones se sont révélés appartenir au noyau moteur de l'hypoglosse. Enfin, nous n'avons pas enregistré de neurones avec une activité électrophysiologique typique nous permettant de limiter le DPGi dans ses parties latérale et rostrale. Finalement, les neurones du DPGi que nous avons pu enregistrer chez l'animal semi-chronique se trouvent donc à une profondeur comprise entre 6.5 et 8 mm par rapport à la surface du cervelet.

B - Activité spontanée des neurones du DPGi au cours du cycle veille-sommeil

Un total de 40 neurones présumés localisés dans le DPGi a été enregistré sur 9 rats habitués à la contention stéréotaxique durant au moins un cycle complet de sommeil (EV, SL et SP). Sur ces 40 neurones, 11 ont été classés comme neurones phasiques. Ils présentaient en effet une activité discontinue durant les différents états de vigilance (avec des pauses d'activités de plusieurs secondes, tableau 5, figure 51). La totalité de ces neurones présentait,

en revanche, une activité étroitement liée à la survenue des mouvements oculaires ou des mouvements des vibrisses (mis en évidence par l'EOG et les enregistrements vidéo).

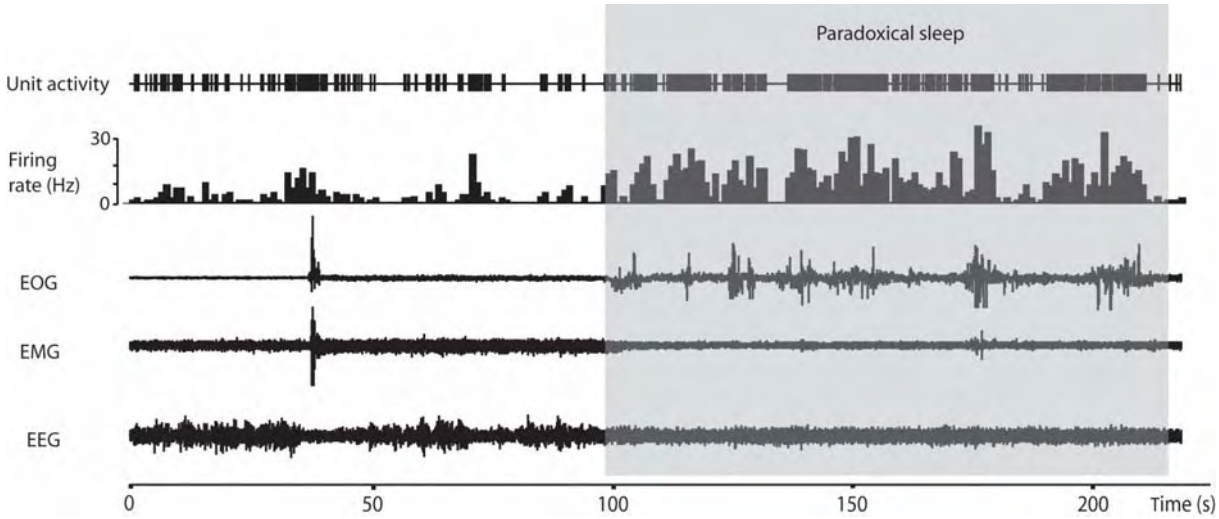


Figure 51 : Activité unitaire d'un neurone phasique du DPGi au cours des différents états de vigilance. Ce neurone présente une activité corrélée à la survenue des mouvements oculaires et des mouvements des vibrisses.

Les 29 neurones présentant une activité tonique ont été divisés en 2 groupes. Le premier groupe est composé de neurones ne présentant pas de modifications de leur fréquence de décharge au cours des différents états de vigilance (n=12, tableau 5). Le calcul des coefficients de variations (CV) et des index d'asymétries indiquent de plus que ces neurones présentent un mode de décharge régulier au cours des différentes phases du cycle veille sommeil (Tableau 5), indiquant que leur activité n'est pas modulée par les états de vigilance..

Le second groupe de neurones toniques (n=17) est composé de neurones présentant une augmentation significative de leur fréquence de décharge durant les épisodes de SP comparée aux épisodes d'EV et de SL. Ces neurones ont donc été classés comme neurones SP-on.

	Index d'asymétrie			Cœfficient de variation			Fréquence de décharge (Hz)		
	EV	**SL**	**SP**	**EV**	**SL**	**SP**	**EV**	**SL**	**SP**
Neurones phasiques (n=11)	0,37±0,1	0,27±0,1	0,16±0,04	1,39±0,55	2,06±0,4	2,9±0,42	8,03±1,9	6,.6±1,6	17,7±4,5
Neurones toniques (n=12)	0,95±0,04	0,71±0,11	0,64±0,1	0,29±0,09	0,64±0,19	0,97±0,33	28±9,4	28,1±8,8	32,3±10,1
Neurones SP-on (n=17)	0,38±0,13	0,36±0,06	0,49±0,05	2,32±0,8	1,62±0,26	1,47±0,16	4,2±0,9	7,3±1,1	46,1±5,1 ***

Tableau 5: Caractéristiques électrophysiologiques (index d'asymétrie, CV et fréquence moyenne de décharge) des différents types neuronaux rencontrés au sein du DPGi.

C - Mode de décharge des neurones SP-on du DPGi

Les neurones SP-on du DPGi présentent une légère augmentation de leur fréquence de décharge durant le SL comparativement à l'EV (4,2 ± 0,9 PA/s vs 7,3 ± 1,1 PA/s; $n = 17$). Durant le SP, ces neurones augmentent très fortement leur fréquence de décharge pour atteindre 46,1 ± 5,1 PA/s ($p<0,001$, figure 52).

Le mode de décharge des neurones SP-on du DPGi, contrairement à leur fréquence de décharge ne présente pas de modification au cours des différents états de vigilance. L'index d'asymétrie ainsi que le CV mettent en évidence un mode de décharge irrégulier durant l'ensemble du cycle veille-sommeil, avec, cependant, une diminution de cette irrégularité de décharge durant le SP (Tableau 5).

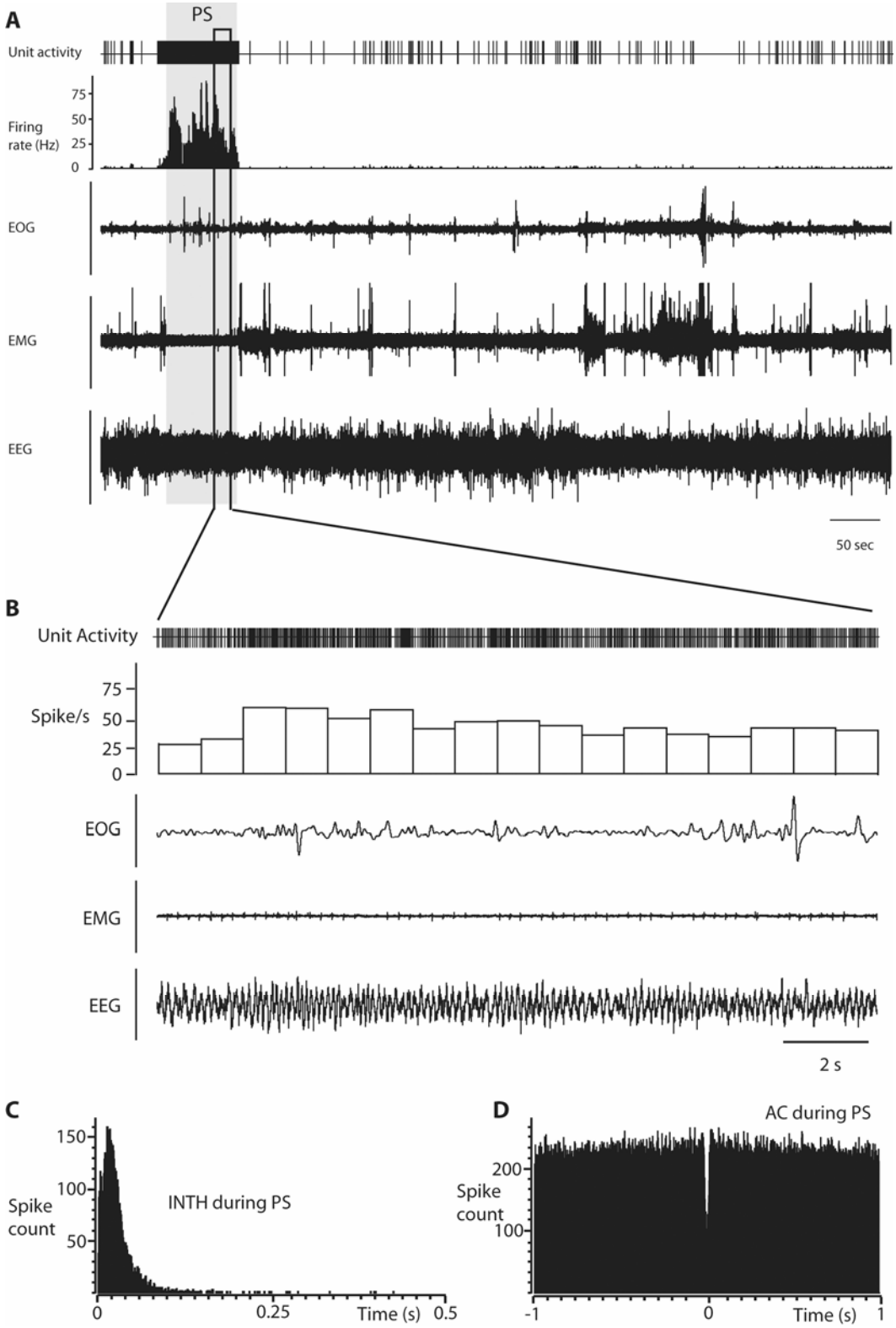
Figure52: Variation du taux de décharge d'un neurone SP-on du DPGi au cours des états de vigilance.

A- Neurone SP-on du DPGi enregistré dans les trois états de vigilance. Ce neurone est très actif durant les phases de SP et commence à décharger avant le début proprement dit de la phase de SP (grisé).

B- Elargissement durant la phase de SP. Notez que la décharge du neurone n'est pas corrélée à la survenue des mouvements oculaires.

C- Histogramme d'intervalles de potentiels d'actions durant le SP. Le pic précoce suivi d'une décroissance lente ainsi que l'absence d'un second pic indique une décharge rapide en groupe de PA.

D- Auto-corrélogramme durant le SP. L'auto-corrélogramme plat indique une absence de motif particulier de décharge.


A
PS
Unit activity
Firing rate (Hz)
75
50
25
0
EOG
EMG
EEG
50 sec
B
Unit Activity
Spike/s
75
50
25
0
EOG
EMG
EEG
2 s
C
Spike count
150
100
50
INTH during PS
0
0.25
Time (s)
0.5
D
AC during PS
Spike count
200
100
-1
0
Time (s)
1

Parmi les 17 neurones SP-on, 15 ont été enregistrés durant la transition SL-SP. La fréquence de décharge de la majorité de ces neurones présente ainsi une forte augmentation dès la fin du SL, environ 15,5 ± 2,3 sec avant le début de la phase de SP proprement dite (le début d'une phase de SP étant caractérisé par l'association de l'atonie musculaire et d'un EEG désynchronisé où prédominent les ondes thêta, figure 53).

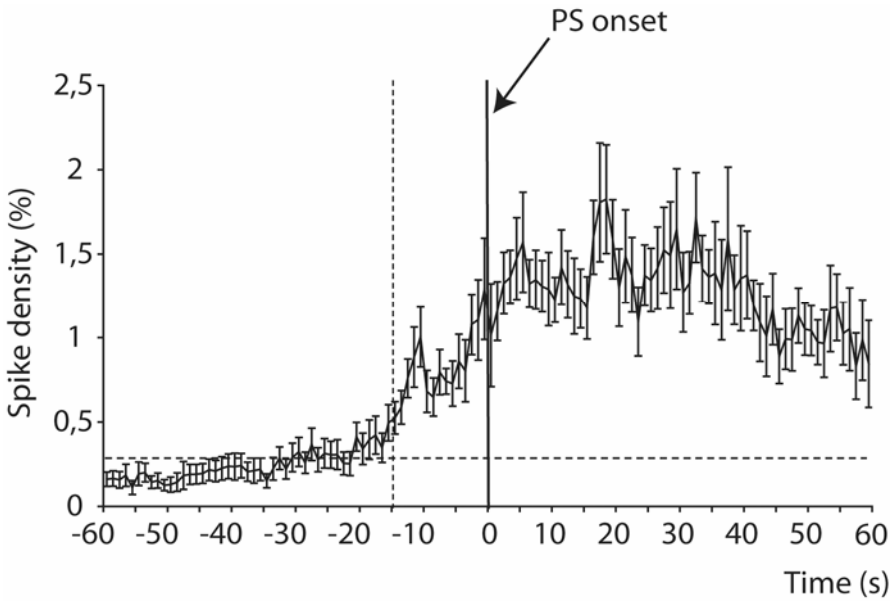


Figure 53: Les neurones SP-on du DPGi anticipent le début des phases de SP.

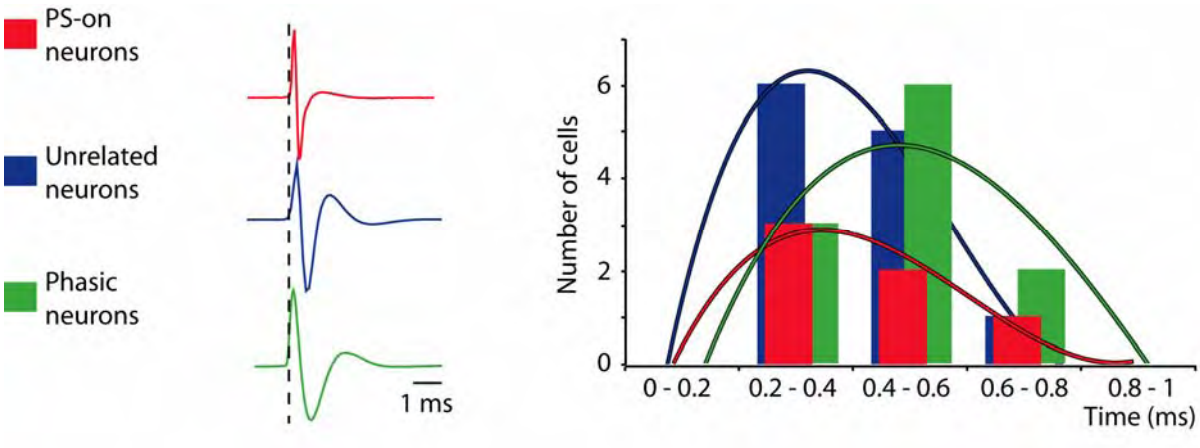


Figure 54 : L'ensemble des neurones enregistrés au sein du DPGi présente des PA de durée brève.

Dans la région ponto-mésencéphalique, les neurones présentant une fréquence de décharge corrélée au cycle veille-sommeil peuvent être classés en deux groupes sur la base de la durée de leurs PA : les neurones présentant des PA brefs et des neurones présentant des PA longs. Théoriquement, tous les neurones monoaminergiques et cholinergiques sont caractérisés par des PA de longues durées alors que les autres neurones, et en particulier les neurones GABAergiques, présentent des PA brefs (Grace et Bunney 1983; Koyama et coll., 1998). Nous avons ainsi mesuré la durée des PA des neurones enregistrés pour déterminer leur classification. Les PA extracellulaires sont généralement caractérisés par une déflection positive suivie d'une déflection négative. Dans cette étude, tous les neurones présentant une déflection positive inférieure à 0,75 ms suivie d'une courte déflection négative ont été classés comme PA de courte durée (Koyama et coll., 1998).

La figure 54 illustre la distribution de la durée des PA des neurones enregistrés au sein du DPGi. Ainsi, l'ensemble des neurones enregistrés dans cette structure sont caractérisés par des PA de brève durée (déflection positive de 0,43 ± 0,03 ms, avec une distribution de 0,22 à 0,69 ms).

II. Neuroanatomie

A – Traçage antérograde

Suite aux injections de PHA-L au sein du DPGi, des fibres antérogradement marquées ont été observées bilatéralement, avec cependant une plus forte intensité ipsilatéralement (Tableau 6 ; n=5 rats). Comme attendu, des fibres marquées à la PHA-L ont été observées au sein des structures impliquées dans la régulation de l'EV, comme le LC, la partie médiane du NRD ou les neurones Hcrt de l'HP (Figure 55 A-C). Au niveau du noyau profond du mésencéphale (DPMe), un grand nombre de fibres a été observé à la jonction de la partie ventro-latérale de la PAG et du DPMe lui-même (Fig 55 D), région à l'origine de l'inhibition des neurones SP-on du SLD (Boissard et coll., 2000; Boissard et coll., 2003). Afin de confirmer l'existence de cette projection du DPGi, nous avons effectué des injections de traceurs rétrogrades (fluorogold) au sein de cette structure (Fig 55 E) (Boissard 2002; Lapray 2005). Ainsi, suite à

ces injections, de nombreux neurones rétrogradement marqués sont visibles au sein du DPGi (Fig 55 F).

Sructure	marquage ipsilatéral	marquage contralatéral	fibres de passage
Septum médian	+	-	-
Bande horizontale et latérale de Broca	+	-	-
Noyau septofimbrial	-	-	-
LPOA (partie ventrale)	-	-	-
Noyau basal de Meynert	-	-	-
Complexe amygdalien		-	-
Stria medullaris	-	-	-
Zona incerta	++	-	+
Zone périfornicale	-	-	-
Thalamus paratenial	-	-	-
Thalamus ventrolatéral	++	-	-
Thalamus paraventriculaire postérieur	+	+	-
Hypothalamus ventromédian	+	-	-
Hypothalamus postérolatéral	+	-	-
Noyau tubéromamillaire	-	-	-
Substance grise périventriculaire	++	+	-
Noyau profond du mésencéphale dorsal	+++	+	+
Colliculus supérieur	+++	+	-
Substance grise périaqueducale ventrale	+++	+++	-
Noyau du III	-	-	-
Noyau interstitiel de Cajal	+++	+	-
Noyau Darkschewitsch	+++	+	-
Noyau du raphé dorsal	++	++	-
Substance grise périaqueducale ventrolatérale	+	+	-
Tegmentum latérodorsal	++	+	-
Tegmentum pédonculopontin	+	-	-
Formation réticulée pontique latérale	++	++	+
Noyau sublatéro dorsal	++++	+++	+
Noyau parabrachial médian et latéral	++++	++	-
Noyau Killiker-Fuse	++++	++	-
Partie sensorielle du nV	++++	+++	-
Locus coeruleus	+	+	-
Noyaux vestibulaires	++++	++++	-
Formation réticulée pontique caudale	++++	+++	-
Noyau Abducens	++++	++++	-
Noyau facial	+++	+++	-
Noyau gigantocellulaire	++++	++++	-
Noyau gigantocellulaire ventral	+++	+++	-
Noyau latéral paragigantocellulaire	+++	++++	-
Olive inférieure caudale	++	++	-

Tableau 6: Localisation et intensité du marquage antérograde observé suite à l'injection de PHA-L au sein du DPGi.

- L'intensité du marquage antérograde est codée d'un faible marquage (-) à un marquage très important (++++).
- La présence, en plus des fibres variqueuses, de fibres de passages est indiquée dans la dernière colonne.

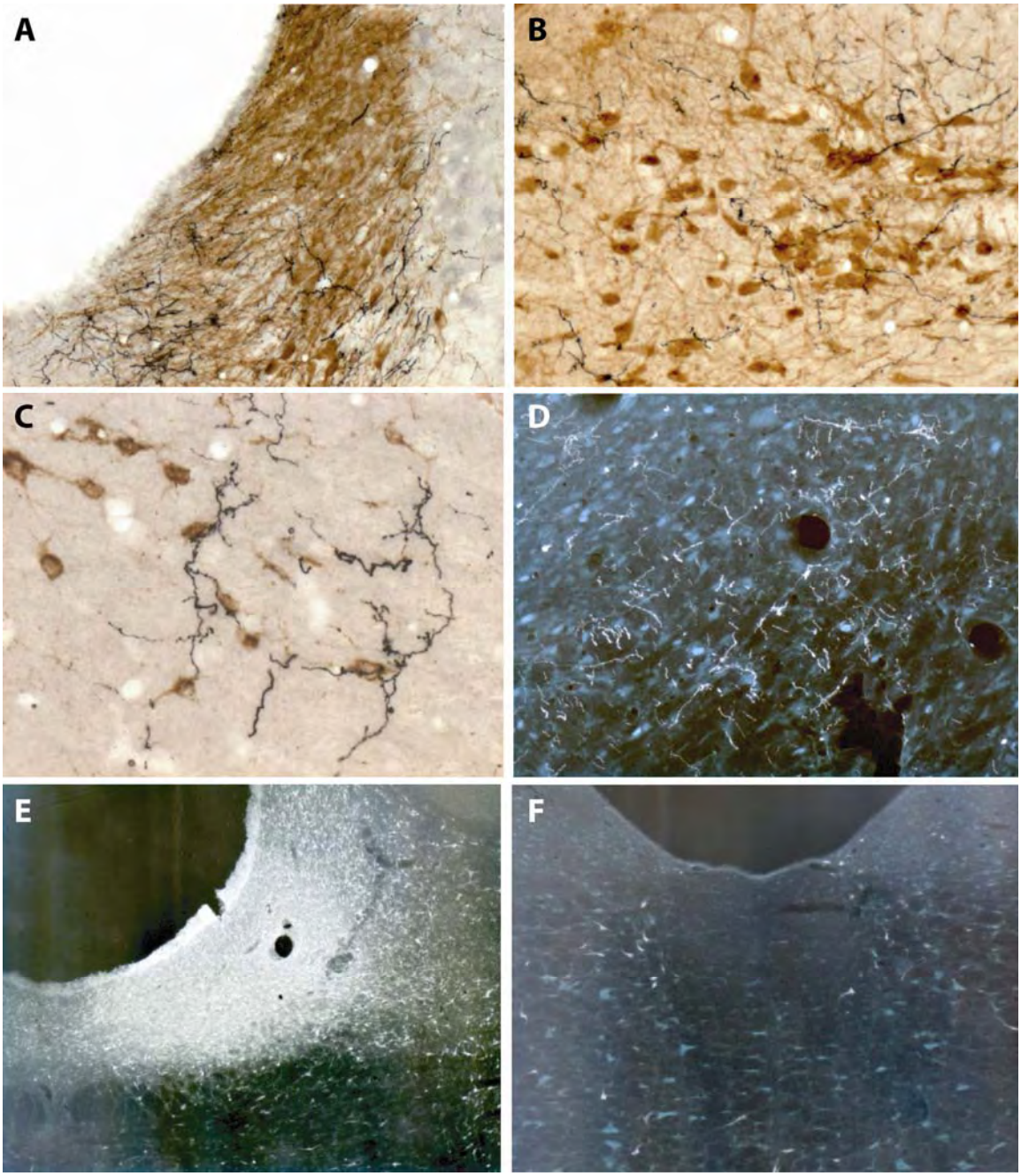


Figure 55 : Principales efférences au DPGi déterminées suite à l'injection iontophorétique de PHA-L. Fibres antérogradement marquées (en noir) au sein **A**- du LC (en marron, marquage à la tyrosine hydroxylase) ; **B**- du NRD (marquage à la 5-HT en marron) ; **C**- de l'HP, au contact des neurones à Hcrt (en marron). **D**- Fibres antérogradement marquées (en blanc) au sein de la vlPAG/DPMe. **E**- Afin de vérifier cette projection, nous avons effectué une injection de Fg vlPAG/DPMe. **F**- Suite à l'injection de Fg illustrée en E, un grand nombre de neurones rétrogradement marqués sont visibles au sein du DPGi (en blanc), confirmant de ce fait les données obtenues avec la PHA-L.

B – Traçage rétrograde

Des injections unilatérales de Fg centrées sur le DPGi ont été effectuées sur 4 rats. Bien que de taille restreinte (~ 500µm^3), les sites d'injections couvraient, en plus du DPGi, la partie ventro-médiane du noyau prépositus hypoglossi (PrH).

Les animaux injectés au Fg ont été divisés en 3 groupes : 1) Des rats témoins, maintenus dans leur baril d'origine tout au long du protocole expérimental (groupe PSC ; n=1) ; 2) des rats privés spécifiquement de SP durant 72h par la méthode dite de la piscine (groupe PSD ; n=1) ; et 3) des rats autorisés à récupérer pendant 3h suite à cette privation (groupe PSR ; n=2). Nous avons alors couplé, chez les animaux PSC, PSD et PSR, l'immunohistochimie du Fg à celle de la protéine du proto-oncogène C-Fos, utilisé comme marqueur d'activité cellulaire. En effet, le DPGi contenant des neurones dont l'activité est spécifique du SP, les neurones Fg/C-Fos suite à la privation de SP devraient correspondre aux neurones à l'origine de leur inhibition durant cet état de vigilance alors que les neurones Fg/C-Fos suite au rebond de SP devraient correspondre aux neurones à l'origine de leur excitation durant ce stade.

Ainsi, nous considérerons particulièrement dans la suite de cette étude les aires cérébrales contenant des neurones doublement marqués Fg+/Fos+.

Localisation des neurones Fg+.

Un grand nombre de neurones rétrogradement marqués est observé dans l'ensemble du névraxe après injection de Fg au sein du DPGi (tableau 7, figure 56).

Cependant, la majorité des neurones marqués se situe caudalement à l'hypothalamus postérieur. Ainsi, les afférence majeures au DPGi sont représentées par le noyau interstitiel de Cajal (NIC, figure 57A), la formation réticulée mésencéphalique (DPMe) et pontique (PRN), dans le PrH (figure 57D), les noyaux vestibulaires (VN) (figure 57C), le SLD et le noyau gigantocellulaire (Gi, figure 57E).

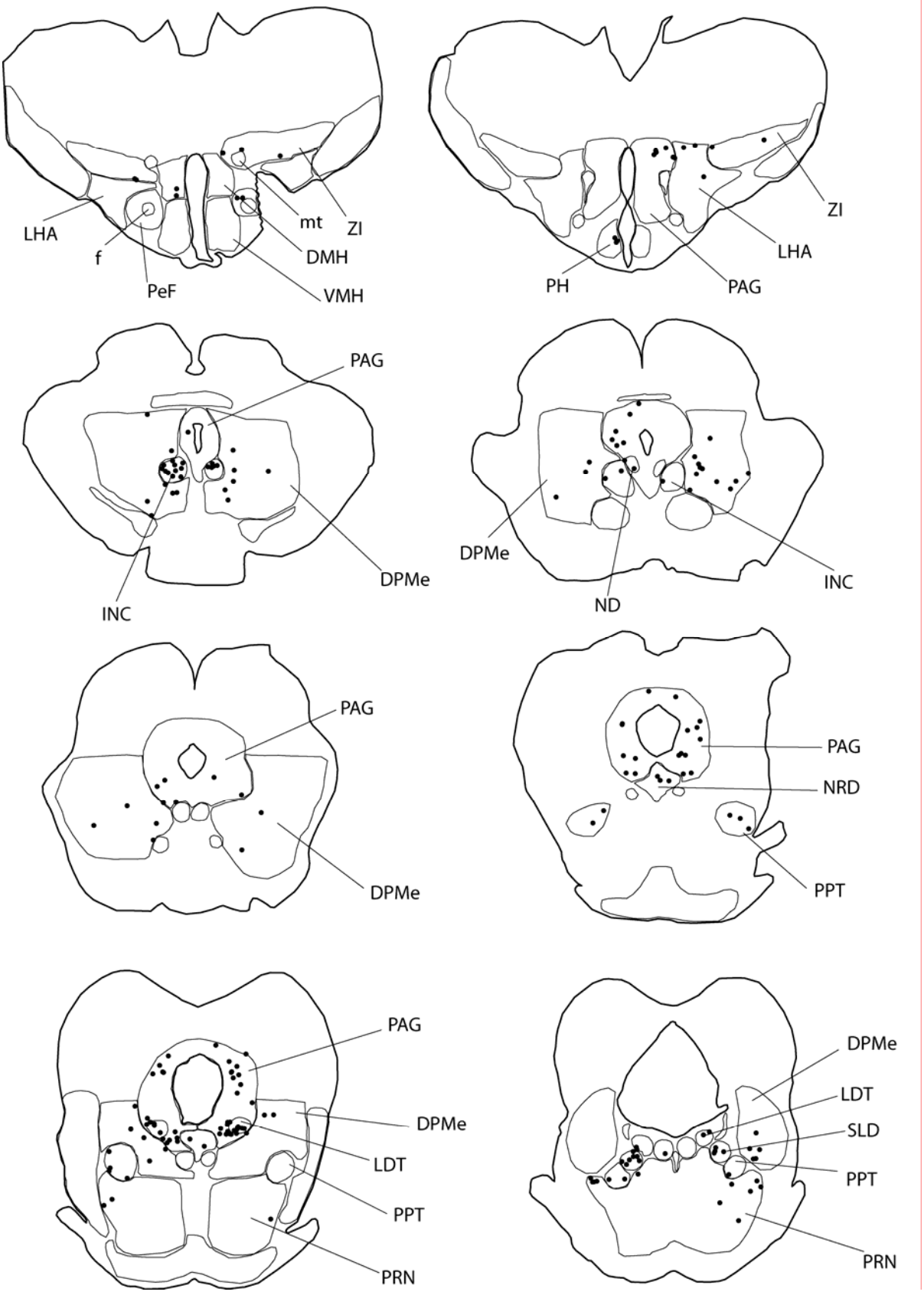
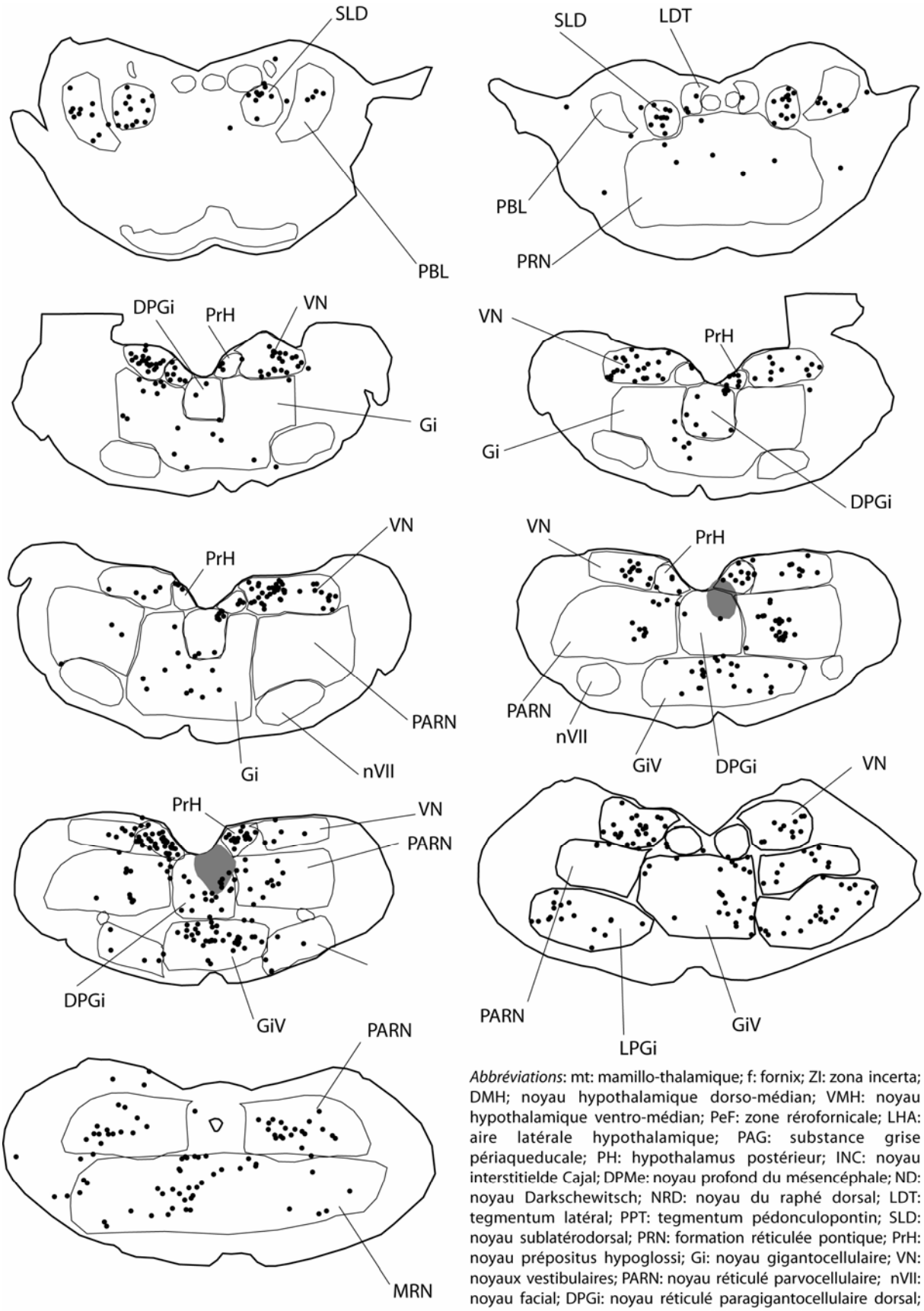


Figure 56 : Cartographie des neurones Fg+ suite à l'injection iontophorétique de Fg au sein du DPGi. Seuls les niveaux contenant des neurones marqués sont représentés et disposés dans l'ordre rostro-caudal. Les sites d'injection de Fg sont représentés en grisé.



Abbréviations: mt: mamillo-thalamique; f: fornix; ZI: zona incerta; DMH; noyau hypothalamique dorso-médian; VMH: noyau hypothalamique ventro-médian; PeF: zone rérofornicale; LHA: aire latérale hypothalamique; PAG: substance grise périaqueducale; PH: hypothalamus postérieur; INC: noyau interstitielde Cajal; DPMe: noyau profond du mésencéphale; ND: noyau Darkschewitsch; NRD: noyau du raphé dorsal; LDT: tegmentum latéral; PPT: tegmentum pédonculopontin; SLD: noyau sublatérodorsal; PRN: formation réticulée pontique; PrH: noyau prépositus hypoglossi; Gi: noyau gigantocellulaire; VN: noyaux vestibulaires; PARN: noyau réticulé parvocellulaire; nVII: noyau facial; DPGi: noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal; GiV: noyau réticulé paragigantocellulaire latéral; MRN: formation réticulée bulbaire

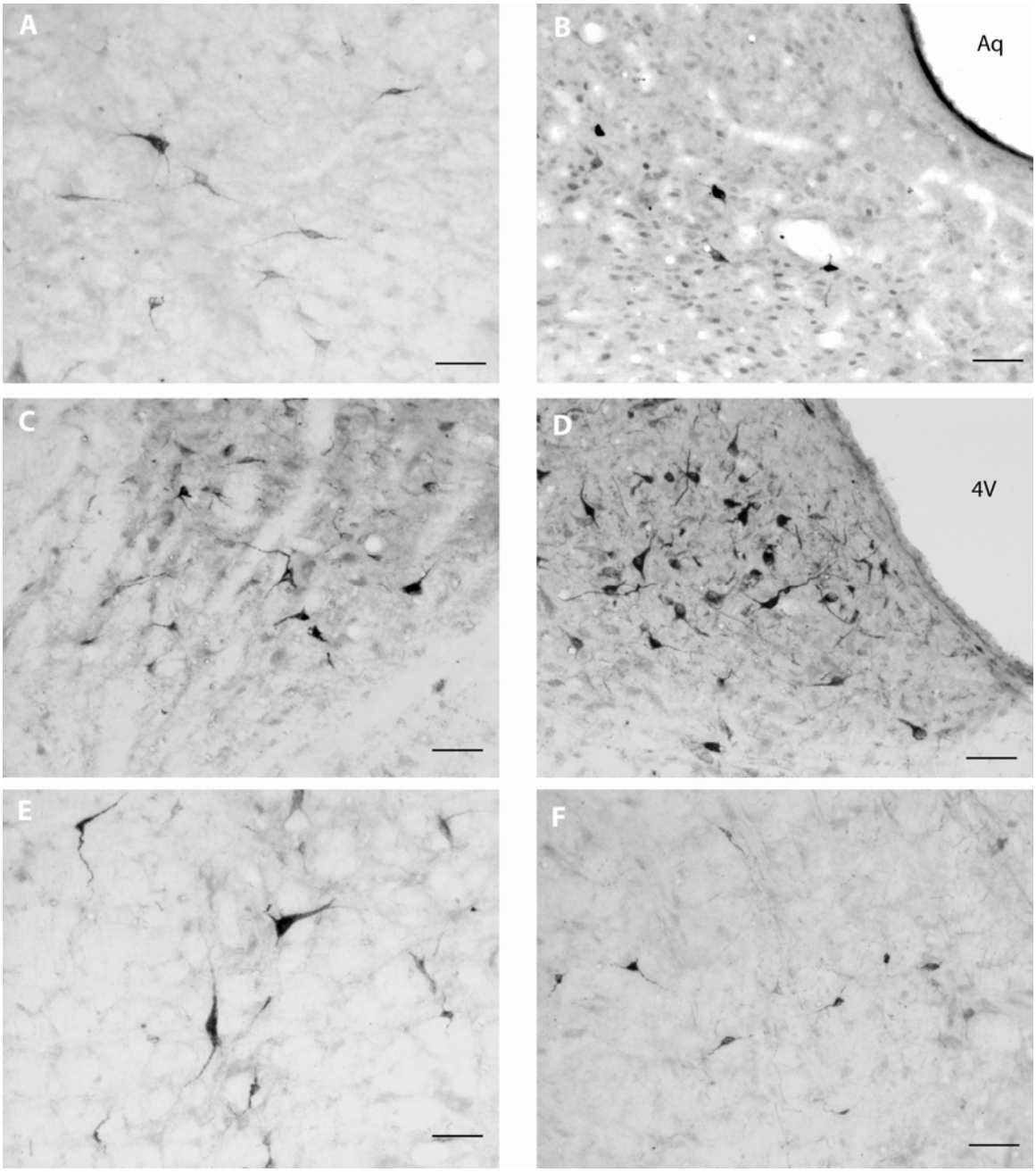


Figure 57 : Principales afférences au DPGi déterminées suite à l'injection iontophorétique de Fg (Echelle : 50µm). Neurones rétrogradement marqués au sein **A**- du noyau interstitiel de Cajal ; **B**- de la vlPAG ; **C**- des noyaux vestibulaires ; **D**- du PrH et **E**- du noyau Gi.

Structures	Nombre coupes par animal (n=4)	Nombre moyen neurones/coupe	Nombre moyen Fg/Fos rebond (n=2 rats)	Nombre moyen Fg/Fos privation (n=1 rat)
ZI	2	3,7 ± 1,7	0,5	0
PeF	1	1,3 ± 0,3	0,5	0
LHA	2	1 ± 0,5	0,5	0
HP	2	1,8 ± 0,3	0	0
NIC	2	10,2 ± 0,7	0,75	0
DPMe	4	10,3 ± 1,3	1,75	0
PAG	5	10 ± 2,7	2,4	3,4
NRD	2	3,5 ± 1,8	0	1,5
LDT	2	5,7 ± 1,3	1	0
PPT	2	6 ± 0,8	1	0
SLD	3	16,1 ± 3,8	4,9	0
PRN	1	17 ± 3	4	0
NV	6	42,9 ± 10,1	1,25	0
Gi	4	13,3 ± 2,4	4	0
PrH	5	17,3 ± 2,6	1,4	0
DPGil	5	7,7 ± 1,6	0,7	0,8
GiV	2	13,7 ± 8,9	2,75	0
LPGil	3	8,8 ± 3,1	0,3	0
MRN	1	32 ± 4,2	1,5	0

Tableau 6 : Nombre moyen (± SEM) de neurones rétrogradements marqués par coupe suite à l'injection de Fg dans le DPGi (1 coupe tout les 500µm). Le nombre de neurones Fg+/Fos+ est indiqué pour les rats rebonds et privés (nombre moyen de neurones par coupes).

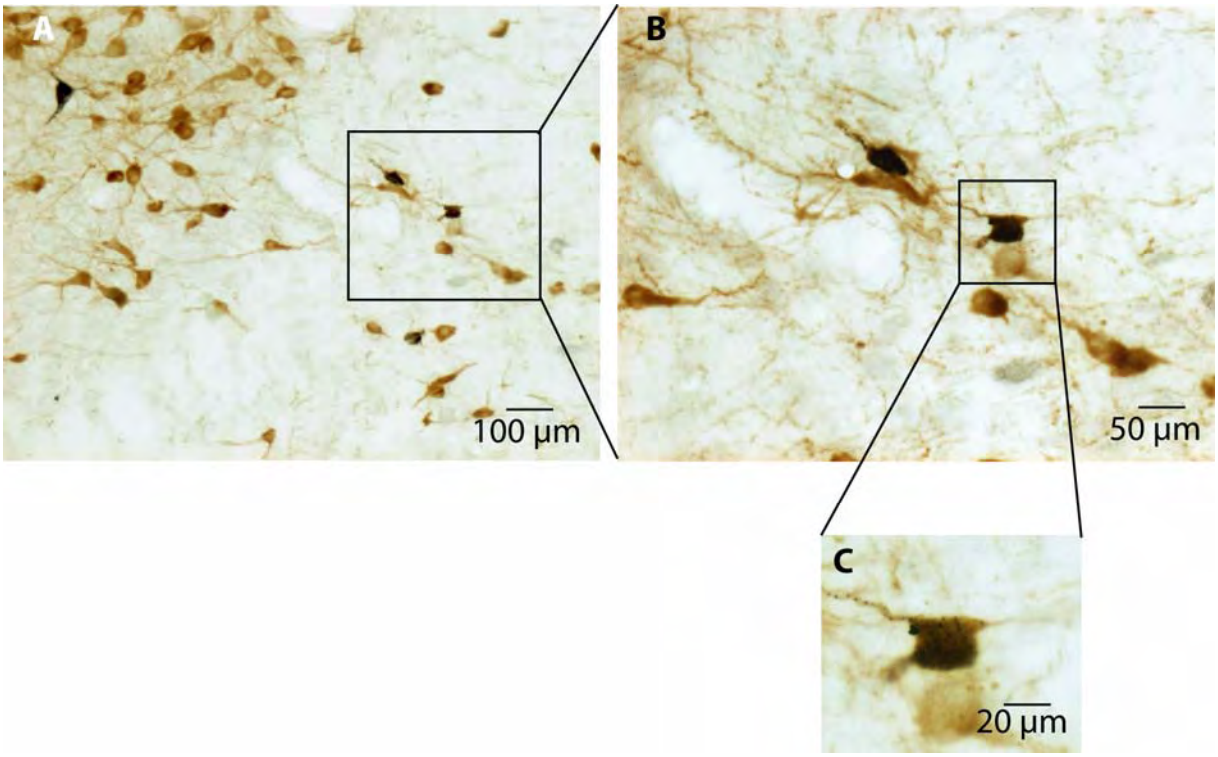


Figure 58 : Neurones rétrogradements marqués (en noir) au sein du LDT. Les neurones cholinergiques du LDT sont mis en évience par imuno-histochimie de la ChAT (l'enzyme de synthèse de l'ACh ; en marron).Notez la présence de neurones doublements marqués (B et C) caractérisé par un cytoplasme marqué en marron et contenant des granules noires.

Il est également observé un marquage plus léger au sein des structures cholinergiques du pont, LDT et PPT (figure 58), de la partie ventro-latérale de la PAG (figure 57B) et du noyau réticulé paragigantocellulaire latéral (LPGi, figure 57F).

Localisation des neurones Fg/C-Fos après privation.

Comme illustré dans la figure 59, seules 3 structures ponto-bulbaires contiennent des neurones projetant directement au DPGi et exprimant le C-Fos suite à la privation de SP : la vlPAG (figure 60A); le Noyau du Raphe dorsal (NRD ; figure 60B) et le DPGi lui-même (figure 60C).

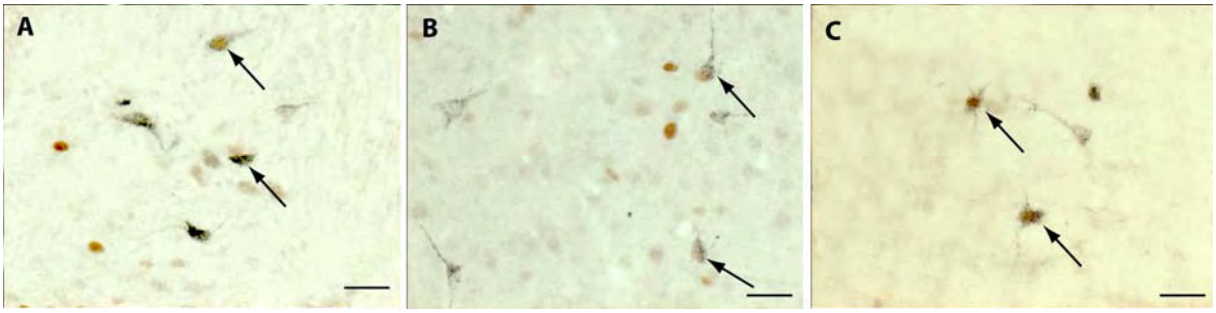


Figure 60 : Photographie illustrant la présence de neurones Fg+/Fos+ au sein de la vlPAG (A), du NRD (B) et du DPGi (C) chez les animaux privés (Echelle : 20µm).

Localisation des neurones Fg/C-Fos après rebond.

Dans le groupe PSR, il a été observé un plus grand nombre de neurones Fg+/Fos+ que dans le groupe PSD (figure 59). Ainsi, ces neurones doublement marqués sont préférentiellement localisés dans le SLD (figure 61 A) ainsi que dans le PRN. Au niveau du site d'injection, un grand nombre de neurones Fg+/Fos+ est retrouvé au sein du DPGi lui-même, mais également au sein du LPGi (figure 61 B).

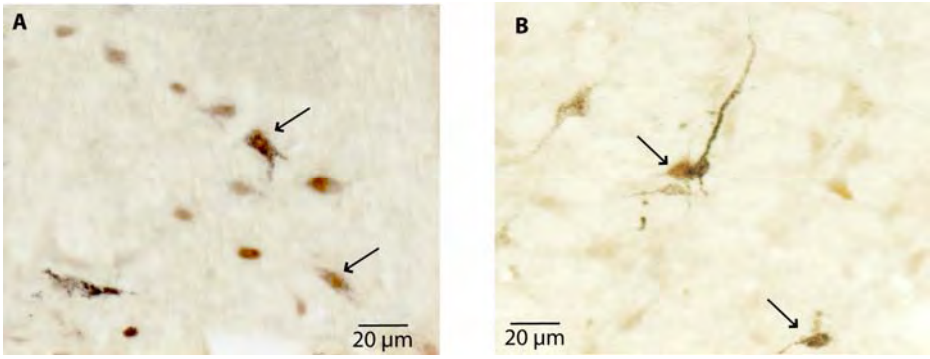


Figure 61 : Photographie illustrant la présence de neurones Fg+/Fos+ au sein du SLD (A) et du LPGi (B) chez les animaux rebond.

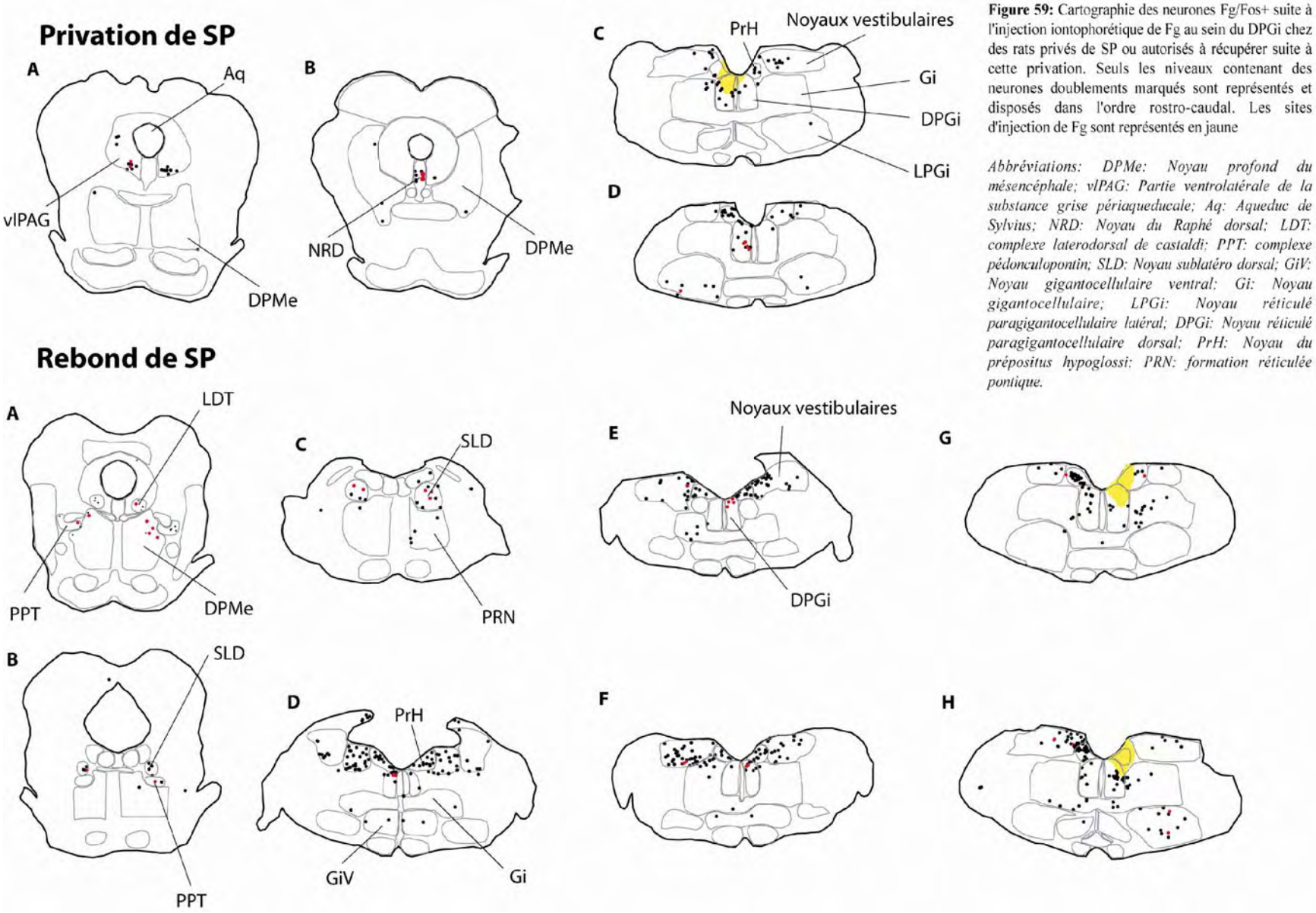


Figure 59: Cartographie des neurones Fg/Fos+ suite à l'injection iontophorétique de Fg au sein du DPGi chez des rats privés de SP ou autorisés à récupérer suite à cette privation. Seuls les niveaux contenant des neurones doublements marqués sont représentés et disposés dans l'ordre rostro-caudal. Les sites d'injection de Fg sont représentés en jaune

Abbréviations: DPMe: Noyau profond du mésencéphale; vlPAG: Partie ventrolatérale de la substance grise périaqueducale; Aq: Aqueduc de Sylvius; NRD: Noyau du Raphé dorsal; LDT: complexe laterodorsal de castaldi; PPT: complexe pédonculopontin; SLD: Noyau sublatéro dorsal; GiV: Noyau gigantocellulaire ventral; Gi: Noyau gigantocellulaire; LPGi: Noyau réticulé paragigantocellulaire latéral; DPGi: Noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal; PrH: Noyau du prépositus hypoglossi; PRN: formation réticulée pontique.

Discussion

I. Electrophysiologie

Les quelques études présentant des enregistrements électrophysiologiques du DPGi ont été effectuées sur le rat anesthésié (Ennis et Aston-Jones 1989). Nous avons donc dû d'abord établir des repères anatomiques et électrophysiologiques du DPGi sur le rat en contention en enregistrant systématiquement au cours des différentes descentes de l'électrode les neurones rencontrés dans l'axe dorso-ventral depuis le cervelet, puis dans le DPGi et enfin dans le noyau gigantocellulaire (Gi). Après un certain nombre d'expériences, il nous a été possible de repérer assez systématiquement le DPGi sur différents animaux et de caractériser l'activité de ses neurones en fonction des états de vigilance et des mouvements de l'animal.

Sur les 40 neurones du DPGi enregistrés dans cette étude, 17 ont présenté une activité corrélée aux états de vigilance. Ces neurones, actifs essentiellement lors des phases de SP, sont situés dans la partie caudale du DPGi. L'enregistrement de ces neurones présente de nombreuses difficultés techniques. En effet, le SP est l'état de vigilance le moins représenté (seulement 10% du temps), ce qui laisse assez peu d'opportunité pour rechercher et obtenir des neurones enregistrables. De plus, en fin de phase de SP, lors du retour du tonus musculaire, les rats ont tendance à effectuer des réajustements posturaux provoquant le plus souvent la perte des neurones. Or, nous avons considéré dans cette étude uniquement les neurones enregistrés dans les 3 états de vigilance. L'analyse morphologique des neurones du DPGi projetant au LC et activés pendant SP (Verret et coll., 2006) montre qu'ils sont d'assez petite taille (entre 15 et 20 µm de diamètre) et donc à la limite des capacités d'enregistrement de leur activité de décharge spontanée. Enfin, la structure visée présente une quantité de neurones d'intérêt sur une assez faible épaisseur (200 à 300 µm).

Nos résultats montrent que le DPGi n'est pas composé d'une population neuronale homogène. En effet, nous avons également enregistré des neurones dont le taux de décharge varie en fonction des mouvements de l'animal et des mouvements oculaires lors des phases d'éveil. Ces résultats sont en accord avec ceux de Spencer et coll. (Spencer et coll., 1989) qui avaient proposé le DPGi et le noyau prepositus hypoglossi adjacent (PrH) comme des structures impliquées dans la coordination visuo-motrice pendant l'éveil. L'utilisation des électrodes d'EOG nous permet en revanche d'affirmer que les neurones SP-on enregistrés ne

présentent pas de variation de leur activité avec les mouvements oculaires rapides caractéristiques du SP et ne semblent donc pas impliqués dans leur contrôle.

Sakai et coll. en 1979 ont été les premiers à décrire des neurones de nature SP-on. De tels neurones ont ainsi été enregistrés dans le péri-LC et dans le noyau magnocellulaire chez le chat (Sakai 1988). Il distingue deux types de neurones, certains actifs uniquement pendant le SP (neurones SP-on) et d'autres montrant une faible activité au cours de l'Ev et du SL (neurones de type II). Plus récemment, Koyama et Hayaishi (1994) dans le LDT, Boissard et coll. (2002) dans le SubCD et Alam et coll. (2002) dans l'HP, ont également décrit chez le rat des neurones de type II.

Dans notre étude, nous avons enregistré des neurones essentiellement de type II en dehors des régions classiquement décrites (LDT, Péri-LC ou SLD et GiV). Ces résultats corroborent les données anatomo-fonctionnelles de Verret et coll. (2006) démontrant la présence de neurones spécifiquement activés par le SP dans le DPGi. Une donnée fondamentale obtenue dans cette étude concerne le profil d'activation de ces neurones aux moments cruciaux que sont les transitions SL-SP. Nous avons observé que, pour la majorité des neurones SP-on enregistrés dans le DPGi, l'augmentation de la fréquence de décharge précède de quelques secondes le début de la phase de SP. Ceci semble indiquer que ces neurones auraient également un rôle à jouer dans la phase précoce de genèse du SP.

II. Neuroanatomie

A – Traçage antérograde

Les injections de PHA-L restreintes au DPGi nous ont permis de mettre en évidence de nombreuses efférences au DPGi. Ainsi, en accord avec les études antérieures (Aston-Jones et coll., 1986; Luppi et coll., 1995), il existe une projection du DPGi sur les neurones NA du LC. Cette projection n'est cependant pas massive et ne représente pas l'efférence principale du DPGi. Or, selon les études d'Aston-Jones et Coll., (1986) et de Luppi et coll., (1995), le DPGi représente l'une des afférences principales au LC. L'une des explications possibles pour réconcilier ces données est que le DPGi est composé d'une population neuronale relativement hétérogène. En effet, nos données neuroanatomiques et électrophysiologiques mettent en évidence l'existence au sein de ce noyau, en plus des neurones SP-on, des neurones dont l'activité est corrélée aux mouvements oculaires de l'animal. Ainsi, seule une partie des

neurones du DPGi serait impliquée dans la régulation des états de vigilance et projetterait au LC. Cette hypothèse semble indirectement appuyée par l'étude de Luppi et coll., (1995). Ces auteurs avaient observé, suite à l'injection de CTb dans le LC, un grand nombre de neurones rétrogradement marqués au sein de l'HP. Afin de confirmer ces résultats, ces auteurs avaient pratiqué des injections de PHA-L dans l'HP. Contrairement aux résultats attendus, ils n'avaient observé qu'un faible nombre de fibres antérogradement marquées au sein du LC. Or, l'on sait aujourd'hui que cette projection de l'HP sur le LC émane des neurones à Hcrt de l'HP (Peyron et coll., 1998). Ainsi, la faible projection du DPGi sur le LC observé dans notre étude ne traduit pas une absence de projection mais plus vraisemblablement le caractère hétérogène de cette structure.

En plus d'une projection sur le LC, nous avons observé des fibres antérogradement marquées au contact d'autres populations neuronales impliquées dans la régulation de l'EV, tels que les neurones 5-HT du NRD et les neurones Hcrt de l'HP. Ainsi, le DPGi semble projeter simultanément à un grand nombre de structures dont le profil d'activité des neurones est identique : ces neurones présentent une activité maximale durant l'EV, diminuée durant le SL et deviennent inactifs durant le SP (Aston-Jones et Bloom 1981; Lydic et coll., 1987; Gervasoni et coll., 2000; Lee et coll., 2005; Mileykovskiy et coll., 2005). Ainsi, le DPGi pourrait être à l'origine de l'inhibition simultanée de plusieurs systèmes d'EV.

Une autre donnée importante obtenue au cours de cette étude est la forte projection du DPGi sur la vlPAG/DPMe. En effet, cette zone contiendrait des neurones GABAergiques à l'origine de l'inhibition du SLD (le centre exécutif du SP chez le rat) au cours de l'EV et du SL (Boissard 2002; Boissard et coll., 2003). De plus, les études d'expression de la protéine C-Fos ont montré que ces neurones étaient activés uniquement pendant la privation spécifique de SP (Verret 2005; Verret et coll., 2005; Verret et coll., 2006). Ainsi, ces neurones seraient de nature SP-off, c'est à dire actifs durant l'EV et le SL et inactifs durant le SP. Leur inactivation durant le SP serait une étape indispensable à la survenue d'un épisode de SP (structure permissive vis-à-vis du SP). Nous émettons l'hypothèse que l'inhibition de la vlPAG/DPMe pendant le SP aurait pour origine les neurones GABAergique SP-on du DPGi.

En conclusion, le DPGi, de par ses projections sur plusieurs systèmes d'EV mais également sur le centre permissif du SP, pourrait jouer un rôle clé dans la régulation du SP en allant inhiber précocement les neurones inhibiteurs du SP (figure 62).

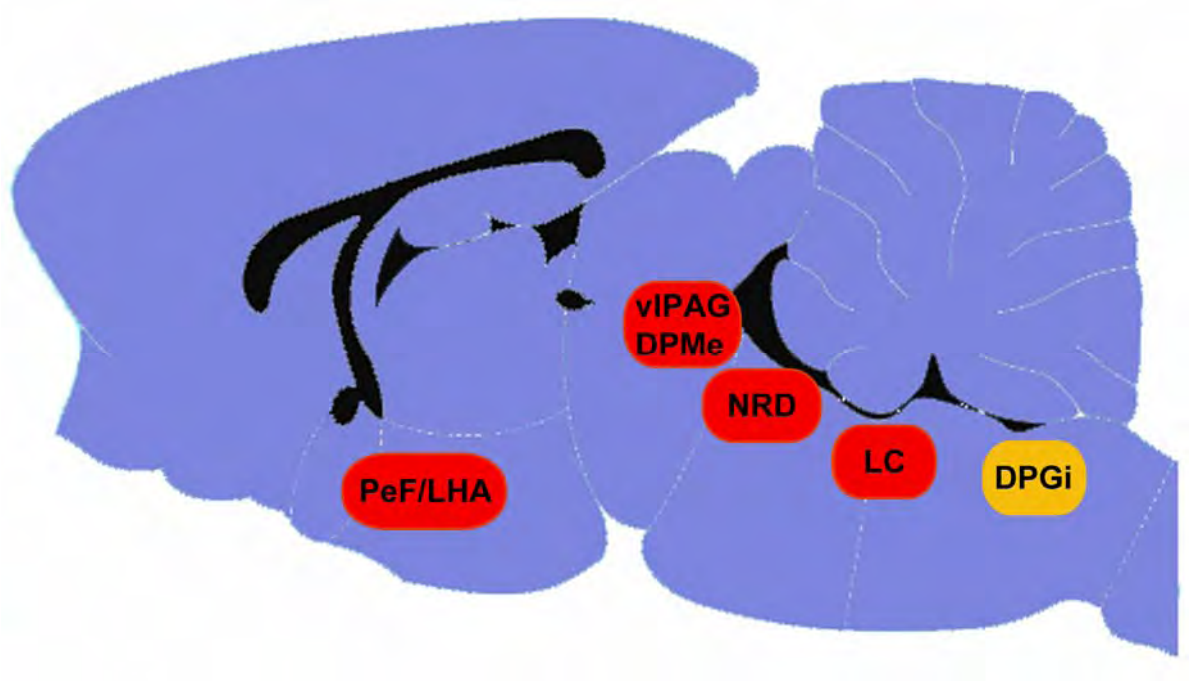


Figure 62 : Représentation schématique des efférences du DPGi sur les structures connues pour leur implication dans la régulation des états de vigilance. L'ensemble de ces structures contient des neurones de type SP-off. Ces neurones seraient ainsi en partie sous un contrôle inhibiteur venant du DPGi durant le SP.

B – Traçage rétrograde

Le but de notre étude était de déterminer les aires cérébrales à l'origine de la régulation des neurones SP-on du DPGi au cours des différents états de vigilance.

De plus, il s'avere que les neurones Fos+ du DPGi ne représente que 29,3 ± 2,6 % des neurones de la région (comptage sur 5 animaux, 1 hémi-coupe analysée par animal, au niveau du marquage Fos le plus important)

Pour ce faire, nous avons couplé l'immuno-histochimie du traceur rétrograde (le Fg) à celle de la protéine du proto-oncogène C-Fos (utilisé comme marqueur d'activité cellulaire) chez des animaux privés sélectivement de SP et chez des animaux autorisés à récupérer de cette privation.

Dans le premier cas de figure, les neurones Fg+/Fos+ pourrait correspondre aux neurones à l'origine de l'inhibition des neurones SP-on du DPGi durant l'EV et le SL alors que dans le second cas de figure, les neurones Fg+/Fos+ correspondraient aux neurones à l'origine de leur activation durant cet état de vigilance.

Neurones potentiellement impliqués dans l'inhibition des neurones SP-on du DPGi durant l'EV et le SL.

Suite à la privation de SP durant 72h, nous avons observé des neurones Fg+/Fos+ au sein de la vlPAG/DPMe et de manière plus restreinte au sein du NRD. Il existerait donc des connections inhibitrices réciproques entre le DPGi, la vlPAG/DPME et le NRD.

Ainsi, l'afférence principale active durant la privation de SP est représentée par la vlPAG/DPMe. Ces neurones, préalablement décrits comme les neurones permissifs du SP seraient ainsi à l'origine de l'inhibition des structures ponto-bulbaires à l'origine de la régulation du SP que sont le SLD et le DPGi.

Le DPGi serait donc sous le contrôle inhibiteur de ces neurones GABAergiques durant l'EV et le SL, mettant encore en évidence un phénomène actif d'inhibition des neurones SP-on, comme précédemment décrit pour les neurones du SLD (Boissard et coll., 2000; Boissard et coll., 2003).

L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'inhibition du SP n'est pas un phénomène passif. Elle semble mettre en jeu des populations neuronales spécifiques et n'est pas simplement le fait de l'activité des neurones monoaminergiques de l'EV.

Neurones potentiellement impliqués dans l'activation des neurones SP-on du DPGi durant le SP.

Suite au rebond de SP, nous avons observé des neurones Fg+/Fos+ au sein du SLD, du PRN, du DPGi lui-même et du LPGi.

Ainsi, les neurones SP-on du DPGi semblent être sous le contrôle de plusieurs populations neuronales déjà décrites comme contenant des neurones de types SP-on (Boissard 2002; Boissard et coll., 2002 ; Verret 2005; Verret et coll., 2005; Verret et coll., 2006).

La principale afférence au DPGi active durant le SP est constituée par les neurones vraisemblablement glutamatergiques du SLD (Boissard et coll., 2002). Ainsi, ces neurones exécutifs du SP, en plus d'être responsables de l'atonie musculaire et de la désynchronisation corticale au cours du SP, seraient responsables de la forte activation des neurones SP-on du DPGi.

Une donnée cruciale manquant encore est le profil d'activation des neurones SP-on du SLD. En effet, nous avons montré que les neurones du DPGi présentaient une activation avant le début de la phase de SP proprement dite. Les neurones SP-on du SLD sont-ils à l'origine du déclenchement de l'activation des neurones du DPGi ou sont-ils préférentiellement impliqués dans le maintien de leur activité tout au long de la phase de SP ?

En effet, d'autres afférences au DPGi actives durant le SP pourraient être à l'origine du déclenchement d'activité des neurones du DPGi. Ainsi, les neurones du PRN, localisés juste rostralement au SLD, pourraient correspondre à de tels neurones. Cependant, il n'y a pas à ce jour d'étude électrophysiologique des neurones de cette région au cours du cycle veille-sommeil.
Enfin, nous avons observé un grand nombre de neurones Fg+/Fos+ au sein du LPGi, structure bulbaire ventrale au DPGi. Or, le LPGi serait une afférence glutamatergique excitatrice majeure du LC (Aston-Jones et coll., 1986; Aston-Jones et coll., 1991). Ainsi, les neurones Fg+/Fos+ observés dans le LPGi après rebond de SP pourraient constituer des neurones glutamatergiques également à l'origine de l'excitation des neurones SP-on du DPGi.

Finalement, nous avons observé une projection des neurones cholinergiques du LDT et du PPT sur le DPGi. L'ACh étant l'un des neurotransmetteurs principaux impliqué dans la régulation du SP chez le chat et le complexe LDT/PPT contenant des neurones de nature SP-on (Koyama et coll., 1994), ils pourraient réguler le DPGi durant les épisodes de SP. Cependant, un étude récente menée au laboratoire (Verret et coll., 2005) a démontré que les neurones cholinergiques du complexe LDT/PPT n'étaient pas immunoréactifs au C-Fos, que ce soit apres privation spécifique ou rebond de SP. Ainsi, les neurones cholinergiques du LDT/PPT ne semblent pas impliqués dans la régulation des neurones SP-on du DPGi durant les épisodes de SP, confirmant de ce fait le rôle mineur de ce neurotransmetteur dans la régulation du SP chez le rongeur (Boissard et coll., 2000; Goutagny et coll. 2005).

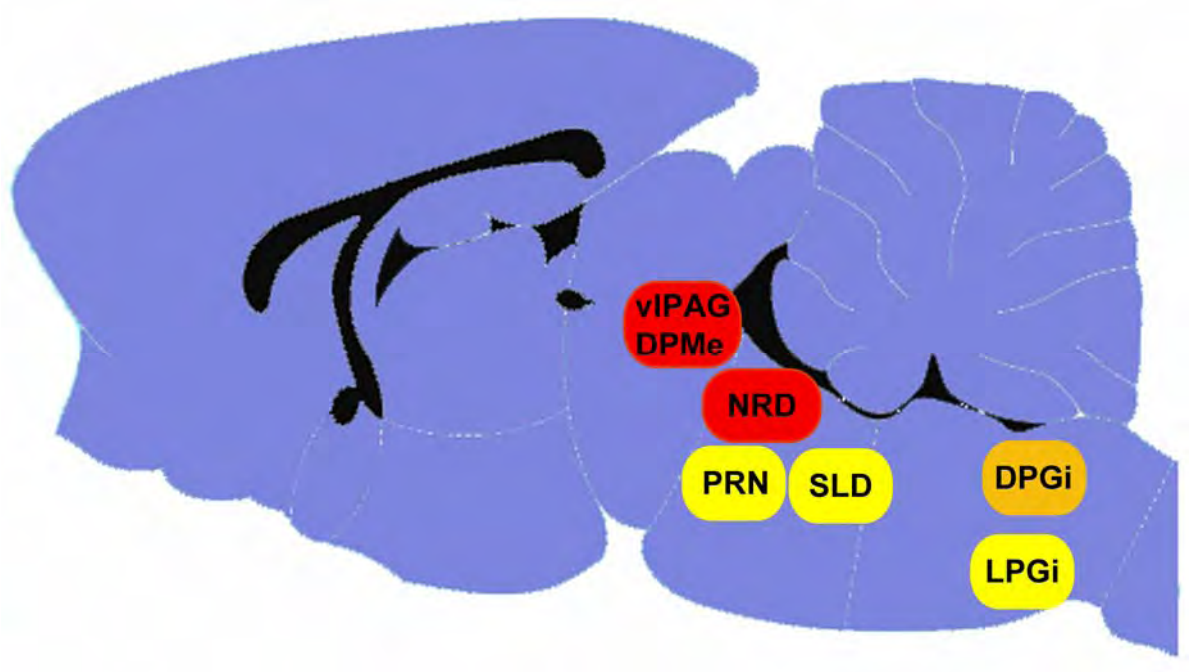


Figure 63 : Représentation schématique des afférences du DPGi. En rouge, les structures contenant des neurones de type SP-off et possiblement à l'origine de l'inhibition des neurones SP-on du DPGi durant l'EV et le SL. En jaune, les structures composées majoritairement de neurones de types SP-on, vraisemblablement excitateurs et possiblement à l'origine de l'activation du DPGi durant le SP.

L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'activation des neurones SP-on du DPGi résulte d'un phénomène actif mettant en jeu différentes populations neuronales (figure 63).

Conclusion

En conclusion, nous avons mis en évidence au sein du DPGi une nouvelle population neuronale à l'origine de la régulation physiologique du SP.

De plus, notre étude neuroanatomique met en évidence l'existence d'un réseau neuronal complexe à l'origine de la régulation du DPGi au cours du cycle veille-sommeil.

Un résultat crucial de notre étude correspond à l'intégration du DPGi au sein du réseau neuronal responsable de la régulation du SP. En effet, le DPGi est interconnecté avec un grand nombre de structures déjà décrites comme primordiales dans la régulation du SP, et en particulier la vlPAG/DPMe.

Ainsi, le DPGi serait inhibé par ces neurones GABAergiques durant l'EV et le SP et son activation serait due d'une part à la levée de cette inhibition, et d'autre part à l'activation des neurones glutamatergiques du SLD. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait effectuer une étude de pharmacologique unitaire des neurones SP-on du DPGi au cours du cycle veille sommeil. De plus, il est maintenant primordial d'observer l'effet sur les différents états de vigilance d'une stimulation ou d'une inhibition réversible du DPGi. Afin de répondre à ces deux questions, le modèle du rat vigile en contention semble la méthode la plus adéquate. Enfin, il est également important d'observer l'effet sur la vigilance, et plus particulierement sur les quantités de SP, de l'inactivation définitive du DPGi. Etant donné la petite taille de cette structure, l'injection iontophorétique d'agents pharmacologiques (acide kaïnique ou iboténique) semble appropriée.

En conclusion, il semblerait que nous ayons aujourd'hui décrypté l'ensemble des réseaux neuronaux à l'origine de la genèse et du maintien du SP. Néanmoins, il reste encore à déterminer les séquences d'activation des différentes structures décrites.

Discussion générale

Résumé des principaux résultats obtenus

L'objectif de notre étude était de mieux comprendre les réseaux neuronaux et les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation du sommeil paradoxal, pré-requis indispensable à une meilleure compréhension du rôle du sommeil. Pour ce faire, nous avons délibérément opté pour une approche expérimentale pluridisciplinaire, combinant l'enregistrement polysomnographique, l'électrophysiologie, la pharmacologie et la neuroanatomie fonctionnelle.
Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont résumés ci-après :

- Nous avons mis en évidence une nouvelle population neuronale impliquée dans la régulation physiologique du SP : les neurones à MCH de l'hypothalamus postérieur.
De plus, nous avons montré que ces neurones n'étaient pas régulés par des afférences GABAergiques inhibitrices, mais plus vraisemblablement par les neurotransmetteurs de l'EV.

- Nous avons montré que les neurones Hcrt, co-localisés au sein de l'HP avec les neurones MCH sont eux inactifs durant le SP et sous le contrôle d'un tonus GABAergique inhibiteur durant cet état de vigilance.

- Nous avons démontré le rôle clé du DPGi dans la régulation du SP. En effet, le DPGi contient de nombreux neurones dont l'activité électrophysiologique est spécifique du SP. De plus, notre étude anatomique a mis en évidence les fortes relations entre le DPGi et de nombreuses structures impliquées dans la régulation du SP. Ainsi, le DPGi semble jouer un rôle central dans la genèse et le maintien de cet état de vigilance.

- Enfin, il apparaît que l'ACh ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans la régulation du SP chez le rongeur. Cependant, de par l'activation de différents sous-types de récepteurs muscariniques (M2, M3 et M4), l'ACh semble jouer un rôle central dans la régulation des oscillations thêta.

Interprétation fonctionnelle

L'ensemble des données obtenues au cours de ce travail ainsi que les travaux effectués depuis 10 ans au sein du laboratoire (Peyron 1996; Rampon 1997; Gervasoni 2000; Boissard 2002; Verret 2005) montrent que nous avons aujourd'hui décrypté sinon l'ensemble, du moins les maillons clés, des réseaux neuronaux responsables de la régulation du SP.

Ainsi, **l'apparition du SP est due à l'activation des neurones SP-on du SLD** (Boissard et coll., 2000). Ces derniers, vraisemblablement glutamatergiques, seraient à l'origine :

- de l'atonie musculaire caractéristique du SP. En effet, Boissard et coll., (2000) ont démontré une projection directe du SLD sur les pré-motoneurones glycinergiques bulbaires. L'excitation de ces neurones glycinergiques du GiV serait ainsi à l'origine de l'hyperpolarisation des motoneurones spinaux.
- de l'activation corticale durant le SP. Il a en effet été mis en évidence une projection du SLD sur les noyaux intralaminaires du thalamus responsables de l'activation corticale au cours de l'EV et du SP.

Comment les neurones du SLD sont-ils régulés au cours du cycle veille-sommeil ? Les études menées chez le chat avaient démontré un rôle clé de l'ACh dans l'induction du SP (Vanni-Mercier et coll., 1989). Cependant, les études pharmacologiques (Boissard et coll., 2000) et neuroanatomiques (Verret et coll., 2005) remettent en cause cette hypothèse chez le rat. De plus, au cours de notre travail de thèse, nous avons confirmé le rôle mineur de ce neurotransmetteur dans la genèse du SP chez la souris.

Les études pharmacologiques de Boissard et coll., (2000) indiquent en revanche que le SLD est sous le contrôle d'un tonus inhibiteur GABAergique durant l'EV et le SL. En effet, l'injection micro-iontophorétique de bicuculline (antagoniste des récepteurs GABAa) au sein du SLD induit un état proche du SP naturel, appellé *SP-like* par ces auteurs. Cependant, la simple levée d'une inhibition ne pourrait être suffisante pour activer les neurones du SLD. En effet, le *SP-like* obtenu suite à l'injection de Bic est supprimé par la co-application d'un antagoniste glutamatergique, l'acide kynurénique. Ainsi, l'activation des neurones du SLD lorsque l'inhibition GABAergique se lève serait de nature glutamatergique. Cependant, le fait de pouvoir induire du *SP-like* en bloquant l'entrée GABAergique au niveau du SLD quelque

soit l'état de vigilance a conduit ces auteurs à supposer que ce tonus excitateur glutamatergique était constant au cours des différents états de vigilance (Boissard 2002).
L'apparition du SP serait donc due à la levée de l'inhibition GABAergique pesant sur les neurones du SLD.

Afin de localiser les neurones possiblement à l'origine de cette inhibition, Boissard et coll., (2003) ont couplé l'immunohistochimie de la GAD (l'enzyme de synthèse du GABA) à l'injection de CTb dans le SLD. Ils ont ainsi observé un grand nombre de neurones doublements marqués à la jonction entre la vlPAG et le DPMe. Ainsi, le SLD serait sous le contrôle inhibiteur des neurones GABAergiques de la vlPAG/DPMe durant l'EV et le SL. Cette hypothèse est confirmée par des études pharmacologiques effectuées chez le chat (Sastre et coll., 1996) et le rat (Boissard 2002; Lapray 2005). En effet, l'injection au sein de cette structure de muscimol, un agoniste GABAergique, induit une augmentation des quantités de SP « physiologique » (i.e. avec présence de mouvements oculaires, d'érections péniennes…). De plus, le rôle clé de cette structure dans l'inhibition du SP est confirmé par des études récentes menées au laboratoire. En effet, il a été montré la présence de nombreux neurones Fos-IR (Verret 2005) de type GABAergique (Emilie Sapin, communication personnelle) dans la vlPAG après privation spécifique de SP, suggérant que les neurones de cette région puissent jouer un rôle inhibiteur central dans le déclenchement du SP.
Les neurones de la VLPAG/DPMe se trouvent donc à un échelon supérieur au SLD au sein du réseau neuronal controlant le SP. De plus, ces neurones, inhibiteurs du SLD durant l'EV et le SL, doivent être de type SP-off, c'est-à-dire actifs durant l'EV et le SL et inactifs en SP.

Comment les neurones de cette structure sont-ils régulés au cours des différents états de vigilance ? D'après les expériences princeps de Jouvet (1962), le SP est toujours présent chez les chats pontiques, où les structures rostrales au pont sont supprimées. Ainsi, les neurones de la vlPAG/DPMe doivent être sous le contrôle de structure(s) ponto-bulbaires.
Basées sur les données obtenues au cours de ce travail de thèse et sur les études neuroanatomiques effectuées au sein du laboratoire (Lapray 2005), deux hypothèses sont envisageables :

- Les neurones GABAergiques de la vlPAG/DPMe sont excités durant l'EV et le SL. Durant l'EV, les neurones monoaminergiques semblent les mieux placés pour être à l'origine de cette excitation. En effet, il a été mis en évidence une forte projection du LC et du

NRD sur la vlPAG/DPME. Durant le SL, l'activité électrophysiologique des neurones monoaminergiques, bien que faible (environ 0,5 Hz), serait suffisante pour maintenir une activation des neurones de la vlPAG/DPMe durant cet état de vigilance.

- A l'instar des neurones du SLD, les neurones de la vlPAG/DPMe sont continuellement excités mais cette inhibition est masquée, durant le SP, par une forte inhibition GABAergique. Au cours de notre thèse, nous avons mis en évidence la présence de nombreuses fibres venant du DPGi au sein de la vlPAG/DPMe. Le DPGi pourrait ainsi être à l'origine de l'hinhibition des neurones de la vlPAG/DPMe durant le SP. En effet, la majorité des neurones actifs suite au rebond de SP sont de nature GABAergique (Emilie Sapin, communication personnelle) et les neurones SP-on du DPGi s'activent plus de 20 sec avant le début proprement dit du SP.

Le DPGi pourrait ainsi être à l'origine de l'inhibition des neurones GABAergiques de la vlPAG/DPMe au cours du SP.

Comment les neurones SP-on du DPGi sont-ils régulés au cours des différents états de vigilance ? Aux vues des résultats de neuroanatomie fonctionnelle obtenus au cours de notre étude, deux hypothèses sont envisageables :

- Le DPGi serait activé durant le SP par une afférence excitatrice (vraissemblablement glutamatergique). Au cours de notre étude, seuls les neurones du SLD, du LPGi et du PRN sont actifs suite au rebond de SP et projettent sur le DPGi. Etant donné l'activité électrophysiologique des neurones SP-on du DPGi et leur très forte anticipation pour le SP, les neurones possiblement à l'origine de leur excitation doivent également fortement anticiper le début du SP. Selon les études électrophysiologiques du SLD (Boissard 2002), ces neurones ne semblent pas en mesure d'être à l'origine de l'activation précoce des neurones du DPGi. Ainsi, les neurones du PRN, localisés juste rostralement au SLD, et ceux du LPGi seraient à l'origine de l'activation des neurones du DPGi. Cependant, il n'y a pas à ce jour d'étude électrophysiologique des neurones de ces régions.

- Le DPGi serait, comme les neurones du SLD, sous un tonus excitateur constant et fortement inhibé durant l'EV et le SL. Seulement deux structures contiennent des neurones actifs suite à la privation de SP et projetant directement au DPGi : le NRD et la vlPAG/DPMe.

Ainsi, durant l'EV et le SL, les neurones du NRD, vraisemblablement GABAergiques (la majorité des neurones activés suite à la privation de SP du NRD sont de nature GABAergique ; Emilie Sapin, communication personelle) ainsi que les neurones de la

vlPAG/DPMe inhiberaient les neurones du DPGi. En retour, et comme montré par notre étude des efférences au DPGi, ce dernier inhiberait les neurones de la vlPAG/DPMe et du NRD.
Il existerait ainsi une interaction inhibitrice réciproque entre deux populations de neurones GABAergiques, l'une inhibant le SP (la vlPAG/DPMe) et l'autre favorisant la survenue de cet état de vigilance (le DPGi).

Ce type de modélisation des réseaux neuronaux du SP permet d'expliquer de manière satisfaisant la survenue périodique de phases de SP. Cependant, elle n'est pas en adéquation avec les données physiologiques indiquant que le SP survient très majoritairement après un épisode de SL (Gervasoni et coll., 2004; Comte et coll. 2006). Afin de compléter ce modèle, il faut donc « ajouter » un étage hypothalamique contenant le centre de régulation du SL (i.e. le VLPO). De plus, les données obtenues au cours de ce travail de thèse apportent de nombreux arguments expérimentaux quant au rôle de l'hypothalamus dans la régulation du SP, et ce par l'intermédiaire des neurones à MCH.
Ces neurones pourraient jouer un rôle clé dans la régulation physiologique du SP, de par :

- Leurs projections, vraisemblablement inhibitrices, sur les neurones du VLPO. Ils seraient ainsi à l'origine de l'inhibition des neurones SL-on de cette structure au cours du SP.
- Leurs projections sur les neurones GABAergiques de la vlPAG/DPMe. Ils pourraient de ce fait participer à l'inhibition de ces neurones, induisant indirectement l'activation des neurones du DPGi et la survenue d'un épisode de SP.

Ces hypothèses sont difficiles à réconcilier avec les expériences princeps de jouvet (1962) montrant que seules les structures ponto-bulbaires sont responsables de la genèse et du maintien du SP. Ainsi, les neurones MCH ne joueraient pas un rôle dans la régulation ultradienne du SP (génèse et durée du SP), mais plutôt dans sa régulation homéostasique et/ou circadienne comme le suggèrent les relations réciproques entre les neurones à MCH et ceux du noyau supra chiasmatique (NSC, centre régulateur des rythmes circadiens, (Abrahamson et coll., 2001). Enfin, la MCH était connue jusque là pour jouer un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire et de la masse pondérale. Nos données suggèrent donc l'existence d'une relation prise alimentaire/sommeil où les neurones MCH pourraient être à l'interface entre les systèmes régulant le métabolisme et le cycle veille-sommeil.
Les neurones MCH de l'hypothalamus postérieur, de par leurs projections sur le VLPO et la vlPAG/DPMe, joueraient un rôle clé dans la régulation homéostatique et/ou circadienne du SP.

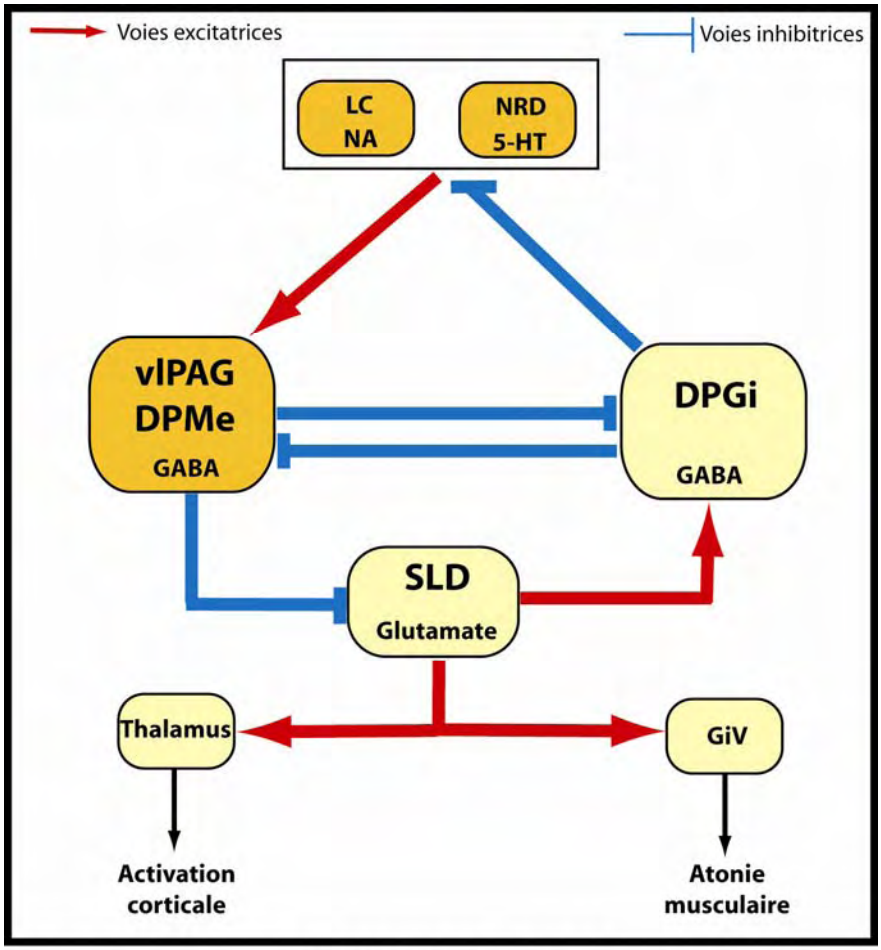


Figure 64 : Représentation schématique des intéractions neuronales ponto-bulbaires responsables de la genèse et du maintien du SP. La genèse et le maintien du SP seraient dus à l'interaction inhibitrice réciproque entre les neurones GABAergiques de la vlPAG/DPMe et les neurones GABAergiques du DPGi. Ainsi, il existerait pour la régulation du SP un mécanisme semblable à celui de « flip-flop » décrit pour la régulation du SL (Saper et coll. 2001). Durant le SP, quand les neurones du DPGi déchargent fortement, ils inhibent les neurones de la vlPAG/DPMe, levant de ce fait l'inhibition et renforcant leur activité. De même, quand les neurones de la vlPAG/DPMe sont actifs (durant l'EV et le SL), ils inhibent le DPGi et renforcent de ce fait leur activité.

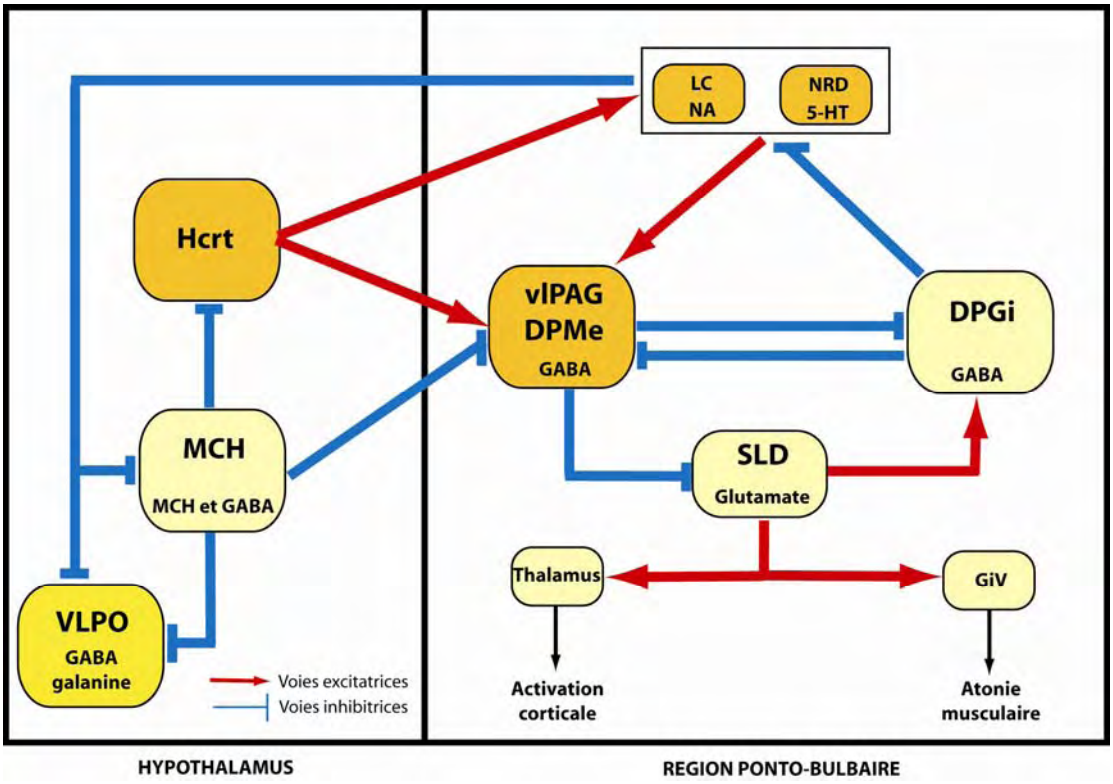


Figure 65 : Représentation schématique des intéractions neuronales hypothalamo-ponto-bulbaires responsables de la genèse et du maintien du SP. Notez le rôle clé joué par les neurones MCH, situés à l'interface entre les systèmes de régulation du SL et du SP.

Conclusion et Perspectives

Au cours de ces 50 dernières années (depuis la découverte du SP comme troisième état de vigilance), d'énormes progrès ont été réalisés dans la compréhension des réseaux neuronaux du SP. Cependant, ces travaux traitaient individuellement chaque état de vigilance.
L'ensemble de nos travaux, associé à ceux menés au sein du laboratoire (Peyron 1996; Rampon 1997; Gervasoni 2000; Boissard 2002; Gallopin 2002; Verret 2005), nous permet maintenant d'avoir une cartographie quasi complète des réseaux neuronaux à l'origine de l'alternance physiologique des différents états de vigilance.

Cependant, plusieurs points cruciaux restent à déterminer :

- Quel est le rôle exact des neurones GABAergiques de la vlPAG/DPMe dans l'inhibition du SP ? Cette structure contient-elle des neurones de type SP-Off, comme suggéré par les études de neuro-anatomie fonctionnelle ? Si oui, quelle est la dynamique d'activation de ces neurones et comment sont-ils régulés au cours du cycle veille-sommeil ?
Afin de répondre à ces questions, une approche électrophysiologique et pharmacologique sur le modèle du rat vigile en contention s'avère la mieux adaptée. De plus, cette technique permettra également, de par l'utilisation de traceurs neuroanatomiques, d'intégrer plus précisément la vlPAG/DPMe au sein des réseaux neuronaux responsables de la régulation du cycle veille-sommeil.

- Quelle est la dynamique d'activation de ces différentes populations neuronales ? Il est en effet maintenant crucial de déterminer les séquences d'activations des différentes populations neuronales identifiées comme clé dans la genèse et le maintien du SP. Une attention toute particulière devra être apportée à l'étude des transitions EV-SL et SL-SP. Pour ce faire, la technique d'enregistrements multi-unitaire multi-sites semble être la plus appropriée.

- Enfin, il est maintenant indispensable d'intégrer la régulation du cycle veille-sommeil avec les autres processus physiologiques. En effet, chez le rongeur comme chez l'homme, l'apparition du sommeil est intimement lié à l'horloge circadienne, à la température corporelle, à l'état énergétique de l'organisme…. Si nous voulons vraiment comprendre le rôle des différents états de vigilance (nous dormons environ 30% de notre vie), nous devrons comprendre les interactions entre ces différents systèmes.

Références bibliographiques

Abrahamson, E. E., Leak, R. K. et Moore, R. Y. (2001). "The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems." Neuroreport **12**(2): 435-40.

Adamantidis, A., Thomas, E., Foidart, A., Tyhon, A., Coumans, B., Minet, A., Tirelli, E., Seutin, V., Grisar, T. et Lakaye, B. (2005). "Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function." Eur J Neurosci **21**(10): 2837-44.

Adrien, J., Alexandre, C., Boutrel, B. et Popa, D. (2004). "Contribution of the "knock-out" technology to understanding the role of serotonin in sleep regulations." Arch Ital Biol **142**(4): 369-77.

Akaoka, H., Roussel, B., Lin, J. S., Chouvet, G. et Jouvet, M. (1991). "Effect of modafinil and amphetamine on the rat catecholaminergic neuron activity." Neurosci Lett **123**(1): 20-2.

Alam, M. N., Gong, H., Alam, T., Jaganath, R., McGinty, D. et Szymusiak, R. (2002). "Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area." J Physiol **538**(Pt 2): 619-31.

Alam, M. N., Kumar, S., Bashir, T., Suntsova, N., Methippara, M. M., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2005). "GABA-mediated control of hypocretin- but not melanin-concentrating hormone-immunoreactive neurones during sleep in rats." J Physiol **563**(Pt 2): 569-82.

Amzica, F. et Steriade, M. (1995). "Disconnection of intracortical synaptic linkages disrupts synchronization of a slow oscillation." J Neurosci **15**(6): 4658-77.

Arnsten, A. F. et Goldman-Rakic, P. S. (1984). "Selective prefrontal cortical projections to the region of the locus coeruleus and raphe nuclei in the rhesus monkey." Brain Res **306**(1-2): 9-18.

Aserinsky, E. et Kleitman, N. (1953). "Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep." Science **118**: 273-274.

Astier, B., Van Bockstaele, E. J., Aston-Jones, G. et Pieribone, V. A. (1990). "Anatomical evidence for multiple pathways leading from the rostral ventrolateral medulla (nucleus paragigantocellularis) to the locus coeruleus in rat." Neurosci Lett **118**(2): 141-6.

Aston-Jones, G. et Bloom, F. E. (1981). "Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle." J Neurosci **1**(8): 876-86.

Aston-Jones, G. et Bloom, F. E. (1981). "Nonrepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli." J Neurosci **1**(8): 887-900.

Aston-Jones, G., Chiang, C. et Alexinsky, T. (1991). "Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance." Prog Brain Res **88**: 501-20.

Aston-Jones, G. et Cohen, J. D. (2005). "An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance." Annu Rev Neurosci **28**: 403-50.

Aston-Jones, G., Ennis, M., Pieribone, V. A., Nickell, W. T. et Shipley, M. T. (1986). "The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network." Science **234**(4777): 734-7.

Backberg, M., Ultenius, C., Fritschy, J. M. et Meister, B. (2004). "Cellular localization of GABA receptor alpha subunit immunoreactivity in the rat hypothalamus: relationship with neurones containing orexigenic or anorexigenic peptides." J Neuroendocrinol **16**(7): 589-604.

Baghdoyan, H. A. et Lydic, R. (1999). "M2 muscarinic receptor subtype in the feline medial pontine reticular formation modulates the amount of rapid eye movement sleep." Sleep **22**(7): 835-47.

Baghdoyan, H. A., Lydic, R., Callaway, C. W. et Hobson, J. A. (1989). "The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine." Neuropsychopharmacology **2**(1): 67-79.

Basheer, R., Halldner, L., Alanko, L., McCarley, R. W., Fredholm, B. B. et Porkka-Heiskanen, T. (2001). "Opposite changes in adenosine A1 and A2A receptor mRNA in the rat following sleep deprivation." Neuroreport **12**(8): 1577-80.

Basheer, R., Porkka-Heiskanen, T., Stenberg, D. et McCarley, R. W. (1999). "Adenosine and behavioral state control: adenosine increases c-Fos protein and AP1 binding in basal forebrain of rats." Brain Res Mol Brain Res **73**(1-2): 1-10.

Basheer, R., Rainnie, D. G., Porkka-Heiskanen, T., Ramesh, V. et McCarley, R. W. (2001). "Adenosine, prolonged wakefulness, and A1-activated NF-kappaB DNA binding in the basal forebrain of the rat." Neuroscience **104**(3): 731-9.

Bassant, M. H., Baleyte, J. M. et Lamour, Y. (1990). "Effects of acetylcholine on single cortical somatosensory neurons in the unanesthetized rat." Neuroscience **39**(1): 189-97.

Bassett, J. R. et Cairncross, K. D. (1975). "Morphological changes induced in rats following prolonged exposure to stress." Pharmacol Biochem Behav **3**(3): 411-20.

Bassetti, C. et Aldrich, M. S. (1996). "Narcolepsy." Neurol Clin **14**(3): 545-71.

Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Saint-Mleux, B., Machard, D., Jones, B. et Muhlethaler, M. (2001). "Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons." Eur J Neurosci **14**(9): 1571-5.

Bayer, L., Mairet-Coello, G., Risold, P. Y. et Griffond, B. (2002). "Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons." Regul Pept **104**(1-3): 33-9.

Bean, A. J. et Roth, R. H. (1991). "Extracellular dopamine and neurotensin in rat prefrontal cortex in vivo: effects of median forebrain bundle stimulation frequency, stimulation pattern, and dopamine autoreceptors." J Neurosci **11**(9): 2694-702.

Benington, J. H. et Heller, H. C. (1995). "Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep." Prog Neurobiol **45**(4): 347-60.

Berger, H. (1929). "Ueber das Elektroenkephalogramm des Menschen." Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten **87**: 527-70.

Berridge, C. W. et Abercrombie, E. D. (1999). "Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis." Neuroscience **93**(4): 1263-70.

Berridge, C. W., Page, M. E., Valentino, R. J. et Foote, S. L. (1993). "Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus." Neuroscience **55**(2): 381-93.

Beuckmann, C. T., Sinton, C. M., Miyamoto, N., Ino, M. et Yanagisawa, M. (2003). "N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences." J Neurosci **23**(17): 6793-7.

Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., Vale, W. et Sawchenko, P. E. (1992). "The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization." J Comp Neurol **319**(2): 218-45.

Bloom, F. E. (1974). "To pritz or not to pritz: the doubtful value of aimless iontophoresis." Life Sciences **14**: 1819-1834.

Boissard, R. (2002). Etude des réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal chez le rat: Approches neeuropharmacologiques, neuroanatomiques et électrophysiologiques. Lyon, Université Claude Bernard, Lyon1**:** 365.

Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. et Luppi, P. H. (2003). "Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurones projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset." European Journal of Neuroscience **18**(6): 1627-39.

Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. et Luppi, P. H. (2003). "Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset." Eur J Neurosci **18**(6): 1627-39.

Boissard, R., Gervasoni, D., Fort, P., Henninot, V., Barbagli, B. et Luppi, P. H. (2000). "Neuronal networks responsible for paradoxical sleep onset and maintenance in rats: a new hypothesis." Sleep **23 Suppl**: 107.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M. H., Barbagli, B., Fort, P. et Luppi, P. H. (2002). "The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study." European Journal of Neuroscience **16**(10): 1959-73.

Booth, V. et Poe, G. R. (2006). "Input source and strength influences overall firing phase of model hippocampal CA1 pyramidal cells during theta: Relevance to REM sleep reactivation and memory consolidation." Hippocampus **16**(2): 161-173.

Borbely, A. A. (1982). "A two process model of sleep regulation." Hum Neurobiol **1**(3): 195-204.

Bouchard, T. J. (1984). Twins reared together and apart: what they tell us about human diversity. Chemical and Biological Bases. S. W. Fox. New York, Plenum Press**:** 1147-1178.

Bouchard, T. J., Jr., Lykken, D. T., McGue, M., Segal, N. L. et Tellegen, A. (1990). "Sources of human psychological differences: the Minnesota Study of Twins Reared Apart." Science **250**(4978): 223-8.

Bourgin, P., Escourrou, P., Gaultier, C. et Adrien, J. (1995). "Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat." Neuroreport **6**(3): 532-6.

Bourgin, P., Huitron-Resendiz, S., Spier, A. D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J. R., Sutcliffe, J. G., Henriksen, S. J. et de Lecea, L. (2000). "Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons." J Neurosci **20**(20): 7760-5.

Brashear, H. R., Zaborszky, L. et Heimer, L. (1986). "Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band." Neuroscience **17**(2): 439-51.

Brown, R. E., Sergeeva, O., Eriksson, K. S. et Haas, H. L. (2001). "Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat." Neuropharmacology **40**(3): 457-9.

Bruat, G. (1965). Optique, Masson & Cie: Paris.

Burdakov, D., Gerasimenko, O. et Verkhratsky, A. (2005). "Physiological Changes in Glucose Differentially Modulate the Excitability of Hypothalamic Melanin-Concentrating Hormone and Orexin Neurons In Situ

10.1523/JNEUROSCI.4925-04.2005." J. Neurosci. **25**(9): 2429-2433.

Burlet, S., Tyler, C. J. et Leonard, C. S. (2002). "Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy." J Neurosci **22**(7): 2862-72.

Buzsaki, G., Bickford, R. G., Ponomareff, G., Thal, L. J., Mandel, R. et Gage, F. H. (1988). "Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat." J Neurosci **8**(11): 4007-26.

Cape, E. G. et Jones, B. E. (2000). "Effects of glutamate agonist versus procaine microinjections into the basal forebrain cholinergic cell area upon gamma and theta EEG activity and sleep-wake state." Eur J Neurosci **12**(6): 2166-84.

Cape, E. G., Manns, I. D., Alonso, A., Beaudet, A. et Jones, B. E. (2000). "Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep." J Neurosci **20**(22): 8452-61.

Caulfield, M. P. (1993). "Muscarinic receptors--characterization, coupling and function." Pharmacol Ther **58**(3): 319-79.

Caulfield, M. P. et Birdsall, N. J. (1998). "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." Pharmacol Rev **50**(2): 279-90.

Cedarbaum, J. M. et Aghajanian, G. K. (1978). "Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique." J Comp Neurol **178**(1): 1-16.

Cespuglio, R., Faradji, H., Hahn, Z. et Jouvet, M. (1984). Voltametric detection of brain 5-hydroxyindolamines by means of electrochemically treated carbon fibre electrodes: chronic recordings for up to one month with movable cerebral electrodes in the sleeping or waking rat. Measurement of neurotransmitter release in vivo. C. A. Mardsen. New York, John Wiley et Sons**:** 289-308.

Cespuglio, R., Houdouin, F., Oulerich, M., El Mansari, M. et Jouvet, M. (1992). "Axonal and somato-dendritic modalities of serotonin release: their involvement in sleep preparation, triggering and maintenance." J Sleep Res **1**(3): 150-156.

Chase, M. H., Chandler, S. H. et Nakamura, Y. (1980). "Intracellular determination of membrane potential of trigeminal motoneurons during sleep and wakefulness." J Neurophysiol **44**(2): 349-58.

Chase, M. H., Enomoto, S., Hiraba, K., Katoh, M., Nakamura, Y., Sahara, Y. et Taira, M. (1984). "Role of medullary reticular neurons in the inhibition of trigeminal motoneurons during active sleep." Exp Neurol **84**(2): 364-73.

Chase, M. H. et Morales, F. R. (1990). "The atonia and myoclonia of active (REM) sleep." Annu Rev Psychol **41**: 557-84.

Cheeta, S., Ruigt, G., van Proosdij, J. et Willner, P. (1997). "Changes in sleep architecture following chronic mild stress." Biol Psychiatry **41**(4): 419-27.

Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J. A., Williams, S. C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T. E., Nakazato, M., Hammer, R. E., Saper, C. B. et Yanagisawa, M. (1999). "Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation." Cell **98**(4): 437-51.

Clavier, R. M. (1979). "Afferent projections to the self-stimulation regions of the dorsal pons, including the locus coeruleus, in the rat as demonstrated by the horseradish peroxidase technique." Brain Res Bull **4**(4): 497-504.

Coleman, C. G., Lydic, R. et Baghdoyan, H. A. (2004). "M2 muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation." Neuroscience **126**(4): 821-30.

Comte, J. C., Schatzman, M., Ravassard, P., Luppi, P. H. et Salin, P. A. (2006). "A three states sleep-waking model." Chaos, Solitons & Fractals **29**(4): 808-815.

Contreras, D. et Steriade, M. (1997). "State-dependent fluctuations of low-frequency rhythms in corticothalamic networks." Neuroscience **76**(1): 25-38.

Contreras, D. et Steriade, M. (1997). "Synchronization of low-frequency rhythms in corticothalamic networks." Neuroscience **76**(1): 11-24.

Cornwall, J., Cooper, J. D. et Phillipson, O. T. (1990). "Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat." Brain Res Bull **25**(2): 271-84.

Dahlstrom, A. et Fuxe, K. (1964). "Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons." Acta Physiol Scand **62**: SUPPL 232:1-55.

Dahlstrom, A. et Fuxe, K. (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." Experientia **20**(7): 398-9.

Darracq, L., Gervasoni, D., Souliere, F., Lin, J. S., Fort, P., Chouvet, G. et Luppi, P. H. (1996). "Effect of strychnine on rat locus coeruleus neurones during sleep and wakefulness." Neuroreport **8**(1): 351-5.

Datta, S. et Siwek, D. F. (2002). "Single cell activity patterns of pedunculopontine tegmentum neurons across the sleep-wake cycle in the freely moving rats." J Neurosci Res **70**(4): 611-21.

de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M. et Sutcliffe, J. G. (1998). "The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 322-7.

De Sereville, J. E., Boer, C., Rambert, F. A. et Duteil, J. (1994). "Lack of pre-synaptic dopaminergic involvement in modafinil activity in anaesthetized mice: in vivo voltammetry studies." Neuropharmacology **33**(6): 755-61.

Dement, W. et Kleitman, N. (1957). "The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming." Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition **53**: 339-346.

Denoyer, M., Buda, C. et Jouvet, M. (1989). "[The destruction of perikaryas of the mesencephalic reticular formation and the posterior hypothalamus does not cause major disorders of awakening in the cat]." C R Acad Sci III **309**(7): 265-74.

Deroche-Gamonet, V., Darnaudery, M., Bruins-Slot, L., Piat, F., Le Moal, M. et Piazza, P. V. (2002). "Study of the addictive potential of modafinil in naive and cocaine-experienced rats." Psychopharmacology (Berl) **161**(4): 387-95.

Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S. et Beaudet, A. (1982). "The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study." J Comp Neurol **207**(3): 239-54.

Deurveilher, S., Hars, B. et Hennevin, E. (1997). "Pontine microinjection of carbachol does not reliably enhance paradoxical sleep in rats." Sleep **20**(8): 593-607.

Dragunow, M. et Faull, R. (1989). "The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing." J Neurosci Methods **29**(3): 261-5.

Duteil, J., Rambert, F. A., Pessonnier, J., Hermant, J. F., Gombert, R. et Assous, E. (1990). "Central alpha 1-adrenergic stimulation in relation to the behaviour stimulating effect of modafinil; studies with experimental animals." Eur J Pharmacol **180**(1): 49-58.

Duttaroy, A., Gomeza, J., Gan, J. W., Siddiqui, N., Basile, A. S., Harman, W. D., Smith, P. L., Felder, C. C., Levey, A. I. et Wess, J. (2002). "Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." Mol Pharmacol **62**(5): 1084-93.

Egan, T. M. et North, R. A. (1986). "Actions of acetylcholine and nicotine on rat locus coeruleus neurons in vitro." Neuroscience **19**(2): 565-71.

Eiser, A. S. (2005). "Physiology and psychology of dreams." Semin Neurol **25**(1): 97-105.

El Kafi, B., Cespuglio, R., Leger, L., Marinesco, S. et Jouvet, M. (1994). "Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hypnogenic properties?" Brain Res **637**(1-2): 211-21.

El Kafi, B., Leger, L., Seguin, S., Jouvet, M. et Cespuglio, R. (1995). "Sleep permissive components within the dorsal raphe nucleus in the rat." Brain Res **686**(2): 150-9.

El Mansari, M., Sakai, K. et Jouvet, M. (1989). "Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats." Exp Brain Res **76**(3): 519-29.

Elias, C. F., Lee, C. E., Kelly, J. F., Ahima, R. S., Kuhar, M., Saper, C. B. et Elmquist, J. K. (2001). "Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus." J Comp Neurol **432**(1): 1-19.

Ennis, M. et Aston-Jones, G. (1988). "Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain." J Neurosci **8**(10): 3644-57.

Ennis, M. et Aston-Jones, G. (1989). "GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla." J Neurosci **9**(8): 2973-81.

Ericson, H., Blomqvist, A. et Kohler, C. (1991). "Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain." J Comp Neurol **311**(1): 45-64.

Eriksson, K. S., Sergeeva, O., Brown, R. E. et Haas, H. L. (2001). "Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus." J Neurosci **21**(23): 9273-9.

Estabrooke, I. V., McCarthy, M. T., Ko, E., Chou, T. C., Chemelli, R. M., Yanagisawa, M., Saper, C. B. et Scammell, T. E. (2001). "Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state." J Neurosci **21**(5): 1656-62.

Felder, C. C. (1995). "Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors." Faseb J **9**(8): 619-25.

Ferraro, L., Antonelli, T., O'Connor, W. T., Tanganelli, S., Rambert, F. A. et Fuxe, K. (1997). "Modafinil: an antinarcoleptic drug with a different neurochemical profile to d-amphetamine and dopamine uptake blockers." Biol Psychiatry **42**(12): 1181-3.

Florin-Lechner, S. M., Druhan, J. P., Aston-Jones, G. et Valentino, R. J. (1996). "Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus." Brain Res **742**(1-2): 89-97.

Fonck, C., Cohen, B. N., Nashmi, R., Whiteaker, P., Wagenaar, D. A., Rodrigues-Pinguet, N., Deshpande, P., McKinney, S., Kwoh, S., Munoz, J., Labarca, C., Collins, A. C., Marks, M. J. et Lester, H. A. (2005). "Novel Seizure Phenotype and Sleep Disruptions in Knock-In Mice with Hypersensitive {alpha}4* Nicotinic Receptors"J. Neurosci. **25**(49): 11396-11411.

Fonnum, F., Karlsen, R. L., Malthe-Sorenssen, D., Skrede, K. K. et Walaas, I. (1979). "Localization of neurotransmitters, particularly glutamate, in hippocampus, septum, nucleus accumbens and superior colliculus." Prog Brain Res **51**: 167-91.

Foote, S. L., Aston-Jones, G. et Bloom, F. E. (1980). "Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 3033-7.

Foote, S. L., Bloom, F. E. et Aston-Jones, G. (1983). "Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity." Physiol Rev **63**(3): 844-914.

Fort, P., Luppi, P. H. et Jouvet, M. (1993). "Glycine-immunoreactive neurones in the cat brain stem reticular formation." Neuroreport **4**(9): 1123-6.

Fort, P., Luppi, P. H., Sakai, K., Salvert, D. et Jouvet, M. (1990). "Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: a double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer." J Comp Neurol **301**(2): 262-75.

Fort, P., Luppi, P. H., Wenthold, R. et Jouvet, M. (1990). "Neurones immunoréactifs à la glycine dans le bulbe rachidien du chat [Glycine immunoreactive neurons in the medulla oblongata in cats]." C R Acad Sci III **311**(5): 205-12.

Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. et Zvartau, E. E. (1999). "Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use." Pharmacol Rev **51**(1): 83-133.

Gallopin, T. (2002). Electrophysiologie et neuromodulation d'un système de contrôle du sommeil lent: Etudes *in vitro* des neurones du noyau préoptique ventro-latéral chez le rat. Neurosciences. Lyon, Université C. Bernard - Lyon1**:** 198.

Gallopin, T., Cauli, B., Luppi, P. H., Rossier, J., Lambolez, B. et Fort, P. (2002). Serotonin modulation reveals two types of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. 3rd Forum of European Neuroscience (FENS), Paris France.

Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P. H., Rossier, J., Audinat, E., Muhlethaler, M. et Serafin, M. (2000). "Identification of sleep-promoting neurons in vitro." Nature **404**(6781): 992-5.

Gallopin, T., Luppi, P. H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B. et Fort, P. (2005). "The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus." Neuroscience **134**(4): 1377-90.

Gallopin, T., Luppi, P. H., Rambert, F. A., Frydman, A. et Fort, P. (2004). "Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study." Sleep **27**(1): 19-25.

Gao, X. B. et van den Pol, A. N. (2001). "Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus." J Physiol **533**(Pt 1): 237-52.

Gao, X. B. et van den Pol, A. N. (2002). "Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons." J Physiol **542**(Pt 1): 273-86.

Geddes, l. A. (1972). Electrodes and measurement of bioelectrics events. The mesurement of action potentials with extracellular electrodes. J. W. a. sons. New York**:** 251-85.

George, R., Haslett, W. L. et Jenden, D. J. (1964). "A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: induction of paradoxixal sleep." Int J Neuropharmacol **3**: 541-552.

Gerfen, C. R. et Sawchenko, P. E. (1984). "An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L)." Brain Res **290**(2): 219-38.

Gervasoni, D. (2000). Neuromodulation de l'activté des neurones monoaminergiques au cours du cycle veille-sommeil: Approches électrophysiologiques- et pharmacologique. Lyon, UCB Lyon 1**:** 334.

Gervasoni, D., Darracq, L., Fort, P., Souliere, F., Chouvet, G. et Luppi, P. H. (1998). "Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep." Eur J Neurosci **10**(3): 964-70.

Gervasoni, D., Lin, S. C., Ribeiro, S., Soares, E. S., Pantoja, J. et Nicolelis, M. A. (2004). "Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions." J Neurosci **24**(49): 11137-47.

Gervasoni, D., Peyron, C., Rampon, C., Barbagli, B., Chouvet, G., Urbain, N., Fort, P. et Luppi, P. H. (2000). "Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons." J Neurosci **20**(11): 4217-25.

Gnadt, J. W. et Pegram, G. V. (1986). "Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat." Brain Res **384**(1): 29-41.

Gomeza, J., Shannon, H., Kostenis, E., Felder, C., Zhang, L., Brodkin, J., Grinberg, A., Sheng, H. et Wess, J. (1999). "Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1692-7.

Gomeza, J., Zhang, L., Kostenis, E., Felder, C., Bymaster, F., Brodkin, J., Shannon, H., Xia, B., Deng, C. et Wess, J. (1999). "Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10483-8.

Gottesmann, C. (1992). "Detection of seven sleep-waking stages in the rat." Neurosci Biobehav Rev **16**(1): 31-8.

Gottesmann, C., Gandolfo, G. et Zernicki, B. (1984). "Intermediate stage of sleep in the cat." J Physiol (Paris) **79**(5): 365-72.

Goutagny, R., Comte, J. C., Salvert, D., Gomeza, J., Yamada, M., Wess, J., Luppi, P. H. et Fort, P. (2005). "Paradoxical sleep in mice lacking M3 and M2/M4 muscarinic receptors." Neuropsychobiology **52**(3): 140-6.

Goutagny, R., Luppi, P. H., Salvert, D., Gervasoni, D. et Fort, P. (2005). "GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle." Neuroreport **16**(10): 1069-73.

Goutagny, R., Verret, L., Fort, P., Salvert, D., Leger, L., Luppi, P. H. et Peyron, C. (2004). "Posterior hypothalamus and regulation of vigilance states." Arch Ital Biol **142**(4): 487-500.

Grace, A. A. et Bunney, B. S. (1983). "Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization." Neuroscience **10**(2): 301-15.

Grace, A. A. et Bunney, B. S. (1983). "Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates." Neuroscience **10**(2): 317-31.

Gritti, I., Mainville, L. et Jones, B. (1993). "Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat." The Journal of Comparative Neurology **329**(4): 438-457.

Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." Nat Rev Neurosci **1**(1): 67-73.

Guyenet, P. G. et Aghajanian, G. K. (1979). "ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: pharmacological evidence for independent sites of action." Eur J Pharmacol **53**(4): 319-28.

Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Methippara, M., Greiffenstein, R., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2005). "Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats." Eur J Neurosci **22**(8): 2111-6.

Haas, H. L. et Reiner, P. B. (1988). "Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus in vitro." J Physiol **399**: 633-46.

Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., Benham, C. D., Taylor, S. G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R. P., Ashmeade, T. E., Shah, A. S., Hatcher, J. P., Hatcher, P. D., Jones, D. N., Smith, M. I., Piper, D. C., Hunter, A. J., Porter, R. A. et Upton, N. (1999). "Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10911-6.

Hairston, I. S., Little, M. T., Scanlon, M. D., Barakat, M. T., Palmer, T. D., Sapolsky, R. M. et Heller, H. C. (2005). "Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning." J Neurophysiol **94**(6): 4224-33.

Hallanger, A. E., Levey, A. I., Lee, H. J., Rye, D. B. et Wainer, B. H. (1987). "The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat." J Comp Neurol **262**(1): 105-24.

Hamilton, B. L. (1973). "Cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat." J Comp Neurol **149**(1): 1-27.

Hancock, M. B. et Fougerousse, C. L. (1976). "Spinal projections from the nucleus locus coeruleus and nucleus subcoeruleus in the cat and monkey as demonstrated by the retrograde transport of horseradish peroxidase." Brain Res Bull **1**(2): 229-34.

Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M. et Sakurai, T. (2001). "Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity." Neuron **30**(2): 345-54.

Hayaishi, O. (2002). "Molecular genetic studies on sleep-wake regulation, with special emphasis on the prostaglandin D(2) system." J Appl Physiol **92**(2): 863-8.

Heimer, L. et Alheid, G. F. (1991). "Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy." Adv Exp Med Biol **295**: 1-42.

Hennevin, E., Hars, B., Maho, C. et Bloch, V. (1995). "Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory." Behav Brain Res **69**(1-2): 125-35.

Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S. et Leslie, R. A. (2000). "The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat." Eur J Neurosci **12**(4): 1194-216.

Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Harrison, D. C., Roberts, J. C. et Leslie, R. A. (2001). "Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord." Neuroscience **103**(3): 777-97.

Hobson, J. A., McCarley, R. W. et Wyzinski, P. W. (1975). "Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups." Science **189**(4196): 55-8.

Hobson, J. A. et Pace-Schott, E. F. (2002). "The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning." Nat Rev Neurosci **3**(9): 679-93.

Holstege, G. et Kuypers, H. G. (1982). "The anatomy of brain stem pathways to the spinal cord in cat. A labeled amino acid tracing study." Prog Brain Res **57**: 145-75.

Holstege, J. C. et Bongers, C. M. (1991). "A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat." Brain Res **566**(1-2): 308-15.

Horvath, T. L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T. S. et van Den Pol, A. N. (1999). "Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system." J Comp Neurol **415**(2): 145-59.

Hsu, S. M., Raine, L. et Fanger, H. (1981). "A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies." Am J Clin Pathol **75**(5): 734-8.

Huang, Z. L., Qu, W. M., Li, W. D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2001). "Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9965-70.

Hughes, P. et Dragunow, M. (1995). "Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system." Pharmacological Reviews **47**: 133-178.

Hulme, E. C., Lu, Z. L., Saldanha, J. W. et Bee, M. S. (2003). "Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 29-34.

Hungs, M., Fan, J., Lin, L., Lin, X., Maki, R. A. et Mignot, E. (2001). "Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines." Genome Res **11**(4): 531-9.

Inoue, I., Yanai, K., Kitamura, D., Taniuchi, I., Kobayashi, T., Niimura, K. et Watanabe, T. (1996). "Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13316-20.

Ishimatsu, M. et Williams, J. T. (1996). "Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions." J Neurosci **16**(16): 5196-204.

Jones, B. E. (1991). "Noradrenergic locus coeruleus neurons: their distant connections and their relationship to neighboring (including cholinergic and GABAergic) neurons of the central gray and reticular formation." Prog Brain Res **88**: 15-30.

Jones, B. E. (1991). "Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain." Neuroscience **40**(3): 637-56.

Jones, B. E. et Cuello, A. C. (1989). "Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons." Neuroscience **31**(1): 37-61.

Jones, B. E., Harper, S. T. et Halaris, A. E. (1977). "Effects of locus coeruleus lesions upon cerebral monoamine content, sleep-wakefulness states and the response to amphetamine in the cat." Brain Res **124**(3): 473-96.

Jouvet, D., Valatx, J. L. et Jouvet, M. (1961). "Etude polygraphique du sommeil du chaton." Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales **155**: 1660-1664.

Jouvet, M. (1962). "Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique." Arch Ital Biol **100**: 125-206.

Jouvet, M. (1962). Sur l'existence d'un système hypnique ponto-limbique. Ses rapports avec l'activité onirique. Symposium sur la Physiologie de l'Hippocampe. P. Passouant. Paris, CNRS.

Jouvet, M. (1965). "Paradoxical Sleep--a Study of Its Nature and Mechanisms." Prog Brain Res **18**: 20-62.

Jouvet, M. (1967). "Neurophysiology of the states of sleep." Physiol Rev **47**(2): 117-77.

Jouvet, M. (1969). "Biogenic amines and the states of sleep." Science **163**(862): 32-41.

Jouvet, M. (1972). "The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle." Ergeb Physiol **64**: 166-307.

Jouvet, M. (1979). "Le comportement onirique." Pour la science **25**: 136-152.

Jouvet, M. (1988). "The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis." Arch Ital Biol **126**(4): 259-74.

Jouvet, M. (1991). "Le sommeil paradoxal est-il le gardien de l'individuation psychologique [Paradoxical sleep: is it the guardian of psychological individualism]." Can J Psychol **45**(2): 148-68.

Jouvet, M. et Delorme, F. (1965). "Locus coeruleus et sommeil paradoxal." CR Seances Soc Biol **159**: 895-899.

Jouvet, M. et Michel, F. (1959). "Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique." CR Soc. Biol. **153**: 422-425.

Jouvet, M., Michel, F. et Courjon, J. (1959). "[On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep]." C R Seances Soc Biol Fil **153**: 1024-8.

Jouvet, M., Michel, F. et Courjon, J. (1959). "Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique." CR Seances Soc Biol **153**: 1024-1028.

Jouvet-Mounier, D. (1968). Ontogenèse des états de vigilance chez quelques mammifères. Lyon, Tixier et fils, Edit.**:** 231.

Jouvet-Mounier, D., Astic, L. et Lacote, D. (1970). "Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month." Dev Psychobiol **2**(4): 216-39.

Ju, G., Han, Z. S. et Fan, L. Z. (1989). "Fluorogold as a retrograde tracer used in combination with immunohistochemistry." J Neurosci Methods **29**(1): 69-72.

Kanamori, N., Sakai, K. et Jouvet, M. (1980). "Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the ventromedial medullary reticular formation of unresdrained cats." Brain Res **189**(1): 251-5.

Kaur, S., Saxena, R. N. et Mallick, B. N. (2001). "GABAergic neurons in prepositus hypoglossi regulate REM sleep by its action on locus coeruleus in freely moving rats." Synapse **42**(3): 141-50.

Kayama, Y., Ohta, M. et Jodo, E. (1992). "Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness." Brain Res **569**(2): 210-20.

Keay, K. A. et Bandler, R. (2001). "Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress." Neurosci Biobehav Rev **25**(7-8): 669-78.

Kerppola, T. K. et Curran, T. (1991). "Transcription factor interactions: basics on zippers." Current Opinion in Structural Biology **1**: 71-79.

Kirk, I. J. (1998). "Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications." Neurosci Biobehav Rev **22**(2): 291-302.

Kiyono, S., Seo, M. L., Shibagaki, M., Watanabe, T., Maeyama, K. et Wada, H. (1985). "Effects of alpha-fluoromethylhistidine on sleep-waking parameters in rats." Physiol Behav **34**(4): 615-7.

Kobbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J. et Thanos, S. (2000). "Current concepts in neuroanatomical tracing." Prog Neurobiol **62**(4): 327-51.

Kodama, T., Lai, Y. Y. et Siegel, J. M. (1992). "Enhancement of acetylcholine release during REM sleep in the caudomedial medulla as measured by in vivo microdialysis." Brain Res **580**(1-2): 348-50.

Kodama, T., Lai, Y. Y. et Siegel, J. M. (1998). "Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis." Brain Res **780**(1): 178-81.

Koella, W. P. (1969). "Serotonin and sleep." Exp Med Surg **27**(1-2): 157-68.

Koella, W. P., Feldstein, A. et Czicman, J. S. (1968). "The effect of para-chlorophenylalanine on the sleep of cats." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **25**(5): 481-90.

Koyama, Y., Honda, T., Kusakabe, M., Kayama, Y. et Sugiura, Y. (1998). "In vivo electrophysiological distinction of histochemically-identified cholinergic neurons using extracellular recording and labelling in rat laterodorsal tegmental nucleus." Neuroscience **83**(4): 1105-12.

Koyama, Y., Jodo, E. et Kayama, Y. (1994). "Sensory responsiveness of "broad-spike" neurons in the laterodorsal tegmental nucleus, locus coeruleus and dorsal raphe of awake rats: implications for cholinergic and monoaminergic neuron-specific responses." Neuroscience **63**(4): 1021-31.

Koyama, Y., Takahashi, K., Kodama, T. et Kayama, Y. (2003). "State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking." Neuroscience **119**(4): 1209-19.

Krueger, J. M., Obal, F., Jr. et Fang, J. (1999). "Why we sleep: a theoretical view of sleep function." Sleep Med Rev **3**(2): 119-29.

Kuhar, M. J., Taylor, K. M. et Snyder, S. H. (1971). "The subcellular localization of histamine and histamine methyltransferase in rat brain." J Neurochem **18**(8): 1515-27.

Lai, Y. Y. et Siegel, J. M. (1988). "Medullary regions mediating atonia." J Neurosci **8**(12): 4790-6.

Lapray, D. (2005). Rôle de la substance grise périaqueducale dans la régulation du sommeil paradoxal: Approche pluridisciplinaire chez le rat. Lyon, Mémoire de recherche; Master recherche en neurosciences**:** 30.

Lavoie, B. et Parent, A. (1994). "Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons." J Comp Neurol **344**(2): 190-209.

Lee, M. G., Hassani, O. K., Alonso, A. et Jones, B. E. (2005). "Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep." J Neurosci **25**(17): 4365-9.

Lee, M. G., Hassani, O. K. et Jones, B. E. (2005). "Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle." J Neurosci **25**(28): 6716-20.

Lena, C., Popa, D., Grailhe, R., Escourrou, P., Changeux, J. P. et Adrien, J. (2004). "Beta2-containing nicotinic receptors contribute to the organization of sleep and regulate putative micro-arousals in mice." J Neurosci **24**(25): 5711-8.

Leppavuori, A. (1980). "The effects of an alpha-adrenergic agonist or antagonist on sleep during blockade of catecholamine synthesis in the cat." Brain Res **193**(1): 117-28.

Levey, A. I., Hallanger, A. E. et Wainer, B. H. (1987). "Choline acetyltransferase immunoreactivity in the rat thalamus." J Comp Neurol **257**(3): 317-32.

Lin, J. S., Hou, Y. et Jouvet, M. (1996). "Potential brain neuronal targets for amphetamine-, methylphenidate-, and modafinil-induced wakefulness, evidenced by c-fos immunocytochemistry in the cat." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14128-33.

Lin, J. S., Hou, Y., Sakai, K. et Jouvet, M. (1996). "Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat." J Neurosci **16**(4): 1523-37.

Lin, J. S., Luppi, P. H., Salvert, D., Sakai, K. et Jouvet, M. (1986). "[Histamine-immunoreactive neurons in the hypothalamus of cats]." C R Acad Sci III **303**(9): 371-6.

Lin, J. S., Roussel, B., Akaoka, H., Fort, P., Debilly, G. et Jouvet, M. (1992). "Role of catecholamines in the modafinil and amphetamine induced wakefulness, a comparative pharmacological study in the cat." Brain Res **591**(2): 319-26.

Lin, J. S., Sakai, K. et Jouvet, M. (1988). "Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat." Neuropharmacology **27**(2): 111-22.

Lin, J. S., Sakai, K. et Jouvet, M. (1994). "Hypothalamo-preoptic histaminergic projections in sleep-wake control in the cat." Eur J Neurosci **6**(4): 618-25.

Lin, J. S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G., Arrang, J. M., Garbarg, M., Schwartz, J. C. et Jouvet, M. (1990). "Involvement of histaminergic neurons in arousal mechanisms demonstrated with H3-receptor ligands in the cat." Brain Res **523**(2): 325-30.

Lin, J. S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G. et Jouvet, M. (1989). "A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats." Brain Res **479**(2): 225-40.

Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P. J., Nishino, S. et Mignot, E. (1999). "The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene." Cell **98**(3): 365-76.

Lindsley, D. B., Bowden, J. et Magoun, H. W. (1949). "Effect upon the EEG of acute injury to the brain stem activating system." Electroencephalography and Clinical Neurophysiology **1**: 475-86.

Lindsley, D. B., Schreiner, L. H., Knowles, W. B. et Magoun, H. W. (1950). "Behavioral and EEG changes following chronic brainstem lesions in cat." Electroencephalography and Clinical Neurophysiology **2**: 483-498.

Liu, R. J., van den Pol, A. N. et Aghajanian, G. K. (2002). "Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions." J Neurosci **22**(21): 9453-64.

Louie, K. et Wilson, M. A. (2001). "Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep." Neuron **29**(1): 145-56.

Lowry, C. A. (2002). "Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." J Neuroendocrinol **14**(11): 911-23.

Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P. et Saper, C. B. (2000). "Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep." J Neurosci **20**(10): 3830-42.

Luppi, P. H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. et Jouvet, M. (1995). "Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde

tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin." Neuroscience **65**(1): 119-60.

Luppi, P. H., Charlety, P. J., Fort, P., Akaoka, H., Chouvet, G. et Jouvet, M. (1991). "Anatomical and electrophysiological evidence for a glycinergic inhibitory innervation of the rat locus coeruleus." Neurosci Lett **128**(1): 33-6.

Luppi, P. H., Fort, P. et Jouvet, M. (1990). "Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons." Brain Res **534**(1-2): 209-24.

Luppi, P. H., Gervasoni, D., Peyron, C., Barbagli, B., Boissard, R. et Fort, P. (1999). Norepinephrine and REM Sleep. Rapid Eye Movement Sleep. B. N. MallicketInoue, S. New Delhi, Norosa Publishing Hoouse**:** 107-122.

Luppi, P. H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D. et Jouvet, M. (1988). "The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer." J Comp Neurol **277**(1): 1-20.

Lydic, R., Douglas, C. L. et Baghdoyan, H. A. (2002). "Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of C57BL/6J mouse enhances rapid eye movement sleep and depresses breathing." Sleep **25**(8): 835-41.

Lydic, R., McCarley, R. W. et Hobson, J. A. (1987). "Serotonin neurons and sleep. I. Long term recordings of dorsal raphe discharge frequency and PGO waves." Arch Ital Biol **125**(4): 317-43.

Lydic, R., McCarley, R. W. et Hobson, J. A. (1987). "Serotonin neurons and sleep. II. Time course of dorsal raphe discharge, PGO waves, and behavioral states." Arch Ital Biol **126**(1): 1-28.

Magoun, H. W. et Rhines, R. (1946). "An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation." J Neurophysiol **9**: 165-171.

Maloney, K. J., Cape, E. G., Gotman, J. et Jones, B. E. (1997). "High-frequency gamma electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat." Neuroscience **76**(2): 541-55.

Maloney, K. J., Mainville, L. et Jones, B. E. (1999). "Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery." J Neurosci **19**(8): 3057-72.

Maloney, K. J., Mainville, L. et Jones, B. E. (2000). "c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery." J Neurosci **20**(12): 4669-79.

Maloney, K. J., Mainville, L. et Jones, B. E. (2002). "c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery." Eur J Neurosci **15**(4): 774-8.

Maquet, P., Laureys, S., Peigneux, P., Fuchs, S., Petiau, C., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Meulemans, T., Luxen, A., Franck, G., Van Der Linden, M., Smith, C. et Cleeremans, A. (2000). "Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep." Nat Neurosci **3**(8): 831-6.

Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M. et Elmquist, J. K. (2001). "Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain." J Comp Neurol **435**(1): 6-25.

Martin, J. H. (1991). The collective electric behavior of cortical neurons: the electroencephalogram and the mechanism of epilepsy. Principles of neural sciences. E. R. Kandel, Schwartz, J. H.etJessel, T. M. Amsterdam, Elseiver**:** 761-75.

Mason, S. T. et Fibiger, H. C. (1979). "Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase." J Comp Neurol **187**(4): 703-24.

Mazzarello, P. (2000). "What dreams may come?" Nature **408**(6812): 523.

McCarley, R. W. et Hobson, J. A. (1975). "Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model." Science **189**(4196): 58-60.

McCarley, R. W. et Massaquoi, S. G. (1992). "Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REM cycle control." J Sleep Res **1**(2): 132-137.

McCormick, D. A. (1989). "Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing." Trends Neurosci **12**(6): 215-21.

McCormick, D. A. et Feeser, H. R. (1990). "Functional implications of burst firing and single spike activity in lateral geniculate relay neurons." Neuroscience **39**(1): 103-13.

McCormick, D. A. et Prince, D. A. (1986). "Mechanisms of ascending control of thalamic neuronal activities: acetylcholine and norepinephrine." Soc Neurosci (Abstr.) **12**: 903.

McCormick, D. A. et Prince, D. A. (1987). "Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei, in vitro." J Physiol **392**: 147-65.

McGinty, D. J. et Sterman, M. B. (1968). "Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat." Science **160**(833): 1253-5.

Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I. et Wainer, B. H. (1984). "Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry." Neuroscience **12**(3): 669-86.

Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H. et Levey, A. I. (1983). "Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6)." Neuroscience **10**(4): 1185-201.

Metherate, R., Cox, C. L. et Ashe, J. H. (1992). "Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine." J Neurosci **12**(12): 4701-11.

Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I. et Siegel, J. M. (2005). "Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons." Neuron **46**(5): 787-98.

Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N. et Wada, H. (1992). "Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats." Physiol Behav **51**(2): 391-4.

Monmaur, P., Puma, C. et Sharif, A. (1994). "Involvement of M2 and non-M2 muscarinic receptors in hippocampal theta rhythm induced by carbachol infusion into the septum of the rat." Brain Res **656**(1): 199-204.

Monnier, M., Sauer, R. et Hatt, A. M. (1970). "The activating effect of histamine on the central nervous system." Int Rev Neurobiol **12**: 265-305.

Monti, J. M., Jantos, H., Boussard, M., Altier, H., Orellana, C. et Olivera, S. (1991). "Effects of selective activation or blockade of the histamine H3 receptor on sleep and wakefulness." Eur J Pharmacol **205**(3): 283-7.

Monti, J. M., Pellejero, T. et Jantos, H. (1986). "Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep and wakefulness in the rat." J Neural Transm **66**(1): 1-11.

Morales, F. R., Engelhardt, J. K., Soja, P. J., Pereda, A. E. et Chase, M. H. (1987). "Motoneuron properties during motor inhibition produced by microinjection of carbachol into the pontine reticular formation of the decerebrate cat." J Neurophysiol **57**(4): 1118-29.

Morales, F. R., Sampogna, S., Yamuy, J. et Chase, M. H. (1999). "c-fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat." J Neurosci **19**(21): 9508-18.

Morgan, J. I. (1990). "Proto-oncogene expression in the nervous system." Discuss Neurosci **VII**: 11-50.

Morgan, J. I. et Curran, T. (1986). "Role of ion flux in the control of c-fos expression." Nature **322**: 552-555.

Morgan, J. I. et Curran, T. (1989). "Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes." Trends Neurosci **12**(11): 459-62.

Morgan, J. I. et Curran, T. (1991). "Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun." Annu Rev Neurosci **14**: 421-51.

Moruzzi, G. et Magoun, H. W. (1949). "Brainstem reticular formation and activation oh the EEG." Electroencephalography and Clinical Neurophysiology **1**: 455-473.

Nakamura, T., Uramura, K., Nambu, T., Yada, T., Goto, K., Yanagisawa, M. et Sakurai, T. (2000). "Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system." Brain Res **873**(1): 181-7.

Nauta, W. J. H. (1946). "hypothalamic regulation of sleep in rats: an experimental study." J Neurophysiol **9**: 285-316.

Nicholson, A. N., Pascoe, P. A. et Stone, B. M. (1985). "Histaminergic systems and sleep. Studies in man with H1 and H2 antagonists." Neuropharmacology **24**(3): 245-50.

Nitz, D. et Siegel, J. (1997). "GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): R451-5.

Nitz, D. et Siegel, J. M. (1996). "GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle." Am J Physiol **271**(6 Pt 2): R1707-12.

Nitz, D. et Siegel, J. M. (1997). "GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state." Neuroscience **78**(3): 795-801.

Nusslein-Volhard, C. et Wieschaus, E. (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." Nature **287**(5785): 795-801.

Okada, Y. (1977). "[Localization and role of GABA (gamma-aminobutyric acid) in the central nervous system (author's transl)]." No To Shinkei **29**(2): 140-7.

Onoe, H. et Sakai, K. (1995). "Kainate receptors: a novel mechanism in paradoxical (REM) sleep generation." Neuroreport **6**(2): 353-6.

Orr, E. et Quay, W. B. (1975). "Hypothalamic 24-hour rhythms in histamine, histidine, decarboxylase and histamine-N-methyltransferase." Endocrinology **96**(4): 941-5.

Pace-Schott, E. F. et Hobson, J. A. (2002). "The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks." Nat Rev Neurosci **3**(8): 591-605.

Pal, D. et Mallick, B. N. (2004). "GABA in pedunculo pontine tegmentum regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABAA receptors in freely moving rats." Neurosci Lett **365**(3): 200-4.

Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S. et Airaksinen, M. S. (1989). "Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain." Neuroscience **28**(3): 585-610.

Panula, P., Yang, H. Y. et Costa, E. (1984). "Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(8): 2572-6.

Pare, D., Smith, Y., Parent, A. et Steriade, M. (1988). "Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei." Neuroscience **25**(1): 69-86.

Pare, D., Steriade, M., Deschenes, M. et Oakson, G. (1987). "Physiological characteristics of anterior thalamic nuclei, a group devoid of inputs from reticular thalamic nucleus." J Neurophysiol **57**(6): 1669-85.

Parmentier, R., Ohtsu, H., Djebbara-Hannas, Z., Valatx, J. L., Watanabe, T. et Lin, J. S. (2002). "Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control." J Neurosci **22**(17): 7695-711.

Pernier, J. et Gerin, P. (1975). "Temporal patterns analysis of spontaneous unit activity in the neocortex." Biol Cybern **18**(3-4): 123-36.

Petitjean, F., Sakai, K., Blondaux, C. et Jouvet, M. (1975). "[Hypersomnia by isthmic lesion in cat. II. Neurophysiological and pharmacological study]." Brain Res **88**(3): 439-53.

Peyron, C. (1996). Identification des neurones suceptibless d'être responsables de l'inactivation des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal chez le rat : approches neuroanatomiques. Lyon**:** 255.

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., Nishino, S. et Mignot, E. (2000). "A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains." Nat Med **6**(9): 991-7.

Peyron, C., Luppi, P. H., Fort, P., Rampon, C. et Jouvet, M. (1996). "Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus." J Comp Neurol **364**(3): 402-413.

Peyron, C., Luppi, P. H., Kitahama, K., Fort, P., Hermann, D. M. et Jouvet, M. (1995). "Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus." Neuroreport **6**(18): 2527-31.

Peyron, C., Petit, J. M., Rampon, C., Jouvet, M. et Luppi, P. H. (1998). "Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods." Neuroscience **82**(2): 443-68.

Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G. et Kilduff, T. S. (1998). "Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems." J Neurosci **18**(23): 9996-10015.

Pickel, V. M., Joh, T. H. et Reis, D. J. (1977). "A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase." Brain Res **131**(2): 197-214.

Pieribone, V. A. et Aston-Jones, G. (1988). "The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei." Brain Res **475**(2): 259-71.

Pinault, D. (1996). "A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin." J Neurosci Methods **65**(2): 113-36.

Pollock, M. S. et Mistlberger, R. E. (2005). "Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of the mouse: further evaluation of a proposed REM sleep enhancement technique." Brain Res **1031**(2): 253-67.

Prell, G. D. et Green, J. P. (1986). "Histamine as a neuroregulator." Annu Rev Neurosci **9**: 209-54.

Radulovacki, M., Miletich, R. S. et Green, R. D. (1982). "N6 (L-phenylisopropyl) adenosine (L-PHA) increases slow-wave sleep (S2) and decreases wakefulness in rats." Brain Res **246**(1): 178-80.

Radulovacki, M., Virus, R. M., Djuricic-Nedelson, M. et Green, R. D. (1984). "Adenosine analogs and sleep in rats." J Pharmacol Exp Ther **228**(2): 268-74.

Rampon, C. (1997). Organisation neuroanatomique des systèmes glycinergiques impliqués dans les mécanismes du sommeil paradoxal. Lyon, Université Claude Bernard, Lyon1**:** 224.

Rampon, C., Luppi, P. H., Fort, P., Peyron, C. et Jouvet, M. (1996). "Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain." Neuroscience **75**(3): 737-55.

Rampon, C., Peyron, C., Gervasoni, D., Pow, D. V., Luppi, P. H. et Fort, P. (1999). "Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and dorsal raphe nuclei: a study combining retrograde tracing with glycine immunohistochemistry." Eur J Neurosci **11**(3): 1058-66.

Rampon, C., Peyron, C., Petit, J. M., Fort, P., Gervasoni, D. et Luppi, P. H. (1996). "Origin of the glycinergic innervation of the rat trigeminal motor nucleus." Neuroreport **7**(18): 3081-5.

Ranson, S. (1939). "Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey." Arch Neurol Psychiatry **41**: 1-23.

Rasmussen, K., Heym, J. et Jacobs, B. L. (1984). "Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats." Exp Neurol **83**(2): 302-17.

Rechtschaffen, A., Bergmann, B. M., Everson, C. A., Kushida, C. A. et Gilliland, M. A. (1989). "Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings." Sleep **12**(1): 68-87.

Reese, N. B., Garcia-Rill, E. et Skinner, R. D. (1995). "The pedunculopontine nucleus--auditory input, arousal and pathophysiology." Prog Neurobiol **47**(2): 105-33.

Ribeiro, S. et Nicolelis, M. A. (2004). "Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep." Learn Mem **11**(6): 686-96.

Rizvi, T. A., Murphy, A. Z., Ennis, M., Behbehani, M. M. et Shipley, M. T. (1996). "Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study." J Neurosci **16**(1): 333-44.

Roussel, B., Buguet, A., Bobillier, P. et Jouvet, M. (1967). "[Locus ceruleus, paradoxal sleep, and cerebral noradrenaline]." C R Seances Soc Biol Fil **161**(12): 2537-41.

Roussel, B., Pujol, J. F. et Jouvet, M. (1976). "Effets des lésions du tegmentum pontique sur les états de sommeil chez le rat [Effects of lesions in the pontine tegmentum on the sleep stages in the rat]." Arch Ital Biol **114**(2): 188-209.

Rye, D. B., Saper, C. B., Lee, H. J. et Wainer, B. H. (1987). "Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum." J Comp Neurol **259**(4): 483-528.

Sagar, S. M., Sharp, F. R. et Curran, T. (1988). "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level." Science **240**(4857): 1328-31.

Saito, Y., Nothacker, H. P., Wang, Z., Lin, S. H., Leslie, F. et Civelli, O. (1999). "Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor." Nature **400**(6741): 265-9.

Sakai, K. (1985). Neurons responsible for paradoxical sleep. Sleep : neurotransmitters and neuromodulators. A. WauquieretJanssen Research Foundation. New York, Raven Press**:** 29-42.

Sakai, K. (1988). "Executive mechanisms of paradoxical sleep." Arch Ital Biol **126**(4): 239-57.

Sakai, K. et Crochet, S. (2001). "Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake-sleep states." Neuroscience **104**(4): 1141-55.

Sakai, K., El Mansari, J. S., Lin, J. S., Zhang, G. et Vanni-Mercier, G. (1990). The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep.

Sakai, K., Kanamori, N. et Jouvet, M. (1979). "[Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the bulbar reticular formation in the unrestrained cat]." C R Seances Acad Sci D **289**(6): 557-61.

Sakai, K. et Koyama, Y. (1996). "Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons?" Neuroreport **7**(15-17): 2449-53.

Sakai, K. et Onoe, H. (1997). "Critical role for M3 muscarinic receptors in paradoxical sleep generation in the cat." Eur J Neurosci **9**(3): 415-23.

Sakai, K., Sastre, J. P., Kanamori, N. et Jouvet, M. (1981). State-specific neurones in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. Brain Mechanisms of Perceptual Awareness and

Purposeful Behavior. O. PompeianoetAimone Marsan, C. New York, Raven Press**:** 405-429.

Sakai, K., Sastre, J. P., Salvert, D., Touret, M., Tohyama, M. et Jouvet, M. (1979). "Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study." Brain Res **176**(2): 233-54.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J. et Yanagisawa, M. (1998). "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior." Cell **92**(4): 573-85.

Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., Muraki, Y., Kageyama, H., Kunita, S., Takahashi, S., Goto, K., Koyama, Y., Shioda, S. et Yanagisawa, M. (2005). "Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice." Neuron **46**(2): 297-308.

Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N. et Jouvet, M. (1989). "Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat." Neuroscience **32**(3): 669-83.

Saper, C. B., Chou, T. C. et Scammell, T. E. (2001). "The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness." Trends Neurosci **24**(12): 726-31.

Sastre, J. P., Buda, C., Kitahama, K. et Jouvet, M. (1996). "Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat." Neuroscience **74**(2): 415-26.

Sastre, J. P. et Jouvet, M. (1979). "Le comportement onirique du chat [Oneiric behavior in cats]." Physiol Behav **22**(5): 979-89.

Satoh, K. et Fibiger, H. C. (1986). "Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections." J Comp Neurol **253**(3): 277-302.

Satoh, S., Matsumura, H. et Hayaishi, O. (1998). "Involvement of adenosine A2A receptor in sleep promotion." Eur J Pharmacol **351**(2): 155-62.

Satoh, S., Matsumura, H., Suzuki, F. et Hayaishi, O. (1996). "Promotion of sleep mediated by the A2a-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the sleep induced by prostaglandin D2 in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5980-4.

Scammell, T. E., Gerashchenko, D. Y., Mochizuki, T., McCarthy, M. T., Estabrooke, I. V., Sears, C. A., Saper, C. B., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2001). "An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons." Neuroscience **107**(4): 653-63.

Schmidt, M. H. (2000). Sleep-Related Penile Erections. Principles and practice of sleep medicine. M. H. Kryger, Roth, T.etDement, W. C. Philadelphia, W.B. Saunders**:** 305-318.

Schmued, L. C. et Fallon, J. H. (1986). "Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties." Brain Res **377**(1): 147-54.

Semba, K. (1993). "Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat." J Comp Neurol **330**(4): 543-56.

Semba, K. et Fibiger, H. C. (1992). "Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study." J Comp Neurol **323**(3): 387-410.

Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F. et Saper, C. B. (1998). "Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat." J Neurosci **18**(12): 4705-21.

Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W. et Saper, C. B. (1996). "Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep." Science **271**(5246): 216-9.

Shipley, M. T., Fu, L., Ennis, M., Liu, W. L. et Aston-Jones, G. (1996). "Dendrites of locus coeruleus neurons extend preferentially into two pericoerulear zones." J Comp Neurol **365**(1): 56-68.

Siegel, J. M. (2001). "The REM sleep-memory consolidation hypothesis." Science **294**(5544): 1058-63.

Simpson, K. L., Altman, D. W., Wang, L., Kirifides, M. L., Lin, R. C. et Waterhouse, B. D. (1997). "Lateralization and functional organization of the locus coeruleus projection to the trigeminal somatosensory pathway in rat." J Comp Neurol **385**(1): 135-47.

Smith, C. (1985). "Sleep states and learning: a review of the animal literature." Neurosci Biobehav Rev **9**(2): 157-68.

Smith, C. et Lapp, L. (1991). "Increases in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period." Sleep **14**(4): 325-30.

Smith, C. T., Conway, J. M. et Rose, G. M. (1998). "Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task." Neurobiol Learn Mem **69**(2): 211-7.

Smith, Y., Pare, D., Deschenes, M., Parent, A. et Steriade, M. (1988). "Cholinergic and non-cholinergic projections from the upper brainstem core to the visual thalamus in the cat." Exp Brain Res **70**(1): 166-80.

Souliere, F., Urbain, N., Gervasoni, D., Schmitt, P., Guillemort, C., Fort, P., Renaud, B., Luppi, P. H. et Chouvet, G. (2000). "Single-unit and polygraphic recordings associated with systemic or local pharmacology: a multi-purpose stereotaxic approach for the awake, anaesthetic-free, and head-restrained rat." J Neurosci Res **61**(1): 88-100.

Spencer, R. F., Wenthold, R. J. et Baker, R. (1989). "Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus." J Neurosci **9**(8): 2718-36.

Steinbusch, H. W. (1984). serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. Handbook of chemical neuroanatomy. A. BjorklundetHokfelt, T. New York, Elseiver**:** 68-125.

Steinbusch, H. W., Nieuwenhuys, R., Verhofstad, A. A. et Van der Kooy, D. (1981). "The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study." J Physiol (Paris) **77**(2-3): 157-74.

Steininger, T. L., Alam, M. N., Gong, H., Szymusiak, R. et McGinty, D. (1999). "Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat." Brain Res **840**(1-2): 138-47.

Steininger, T. L., Gong, H., McGinty, D. et Szymusiak, R. (2001). "Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups." J Comp Neurol **429**(4): 638-53.

Steininger, T. L., Wainer, B. H., Blakely, R. D. et Rye, D. B. (1997). "Serotonergic dorsal raphe nucleus projections to the cholinergic and noncholinergic neurons of the pedunculopontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study." J Comp Neurol **382**(3): 302-22.

Stenberg, D., Litonius, E., Halldner, L., Johansson, B., Fredholm, B. B. et Porkka-Heiskanen, T. (2003). "Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor." J Sleep Res **12**(4): 283-90.

Steriade, M. (2000). "Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation." Neuroscience **101**(2): 243-76.

Steriade, M. et Biesold, D. (1990). Brain cholinergic systems. Oxford ; New York, Oxford University Press.

Steriade, M., Deschenes, M., Domich, L. et Mulle, C. (1985). "Abolition of spindle oscillations in thalamic neurons disconnected from nucleus reticularis thalami." J Neurophysiol **54**(6): 1473-97.

Steriade, M., Domich, L., Oakson, G. et Deschenes, M. (1987). "The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity." J Neurophysiol **57**(1): 260-73.

Steriade, M., Dossi, R. C. et Nunez, A. (1991). "Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression." J Neurosci **11**(10): 3200-17.

Steriade, M., Nunez, A. et Amzica, F. (1993). "Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram." J Neurosci **13**(8): 3266-83.

Stickgold, R., Hobson, J. A., Fosse, R. et Fosse, M. (2001). "Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing." Science **294**(5544): 1052-7.

Stickgold, R. et Walker, M. P. (2005). "Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep?" Trends Neurosci **28**(8): 408-15.

Stoeckel, K., Schwab, M. et Thoenen, H. (1977). "Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin." Brain Res **132**(2): 273-85.

Stone, T. W. (1985). Microiontophoresis and pressure ejection. Chichester ; New York, Wiley.

Strecker, R. E., Morairty, S., Thakkar, M. M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin, L. J., Rainnie, D. G., Portas, C. M., Greene, R. W. et McCarley, R. W. (2000). "Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state." Behav Brain Res **115**(2): 183-204.

Swanson, L. W. et Hartman, B. K. (1975). "The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections

in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker." J Comp Neurol **163**(4): 467-505.

Swett, C. P. et Hobson, J. A. (1968). "The effects of posterior hypothalamic lesions on behavioral and electrographic manifestations of sleep and waking in cats." Arch Ital Biol **106**(3): 283-93.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L. et McGinty, D. (1998). "Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats." Brain Res **803**(1-2): 178-88.

Szymusiak, R. et McGinty, D. (1986). "Sleep suppression following kainic acid-induced lesions of the basal forebrain." Exp Neurol **94**(3): 598-614.

Tashiro, M., Mochizuki, H., Iwabuchi, K., Sakurada, Y., Itoh, M., Watanabe, T. et Yanai, K. (2002). "Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: functional neuroimaging of histamine H1 receptors in human brain." Life Sci **72**(4-5): 409-14.

Timofeev, I., Grenier, F. et Steriade, M. (2001). "Disfacilitation and active inhibition in the neocortex during the natural sleep-wake cycle: an intracellular study." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1924-9.

Timofeev, I. et Steriade, M. (1996). "Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats." J Neurophysiol **76**(6): 4152-68.

Timo-Iaria, C., Negrao, N., Schmidek, W. R., Hoshino, K., Lobato de Menezes, C. E. et Leme da Rocha, T. (1970). "Phases and states of sleep in the rat." Physiol Behav **5**(9): 1057-62.

Tononi, G. et Cirelli, C. (2001). "Modulation of brain gene expression during sleep and wakefulness: a review of recent findings." Neuropsychopharmacology **25**(5 Suppl): S28-35.

Torterolo, P., Yamuy, J., Sampogna, S., Morales, F. R. et Chase, M. H. (2003). "Hypocretinergic neurons are primarily involved in activation of the somatomotor system." Sleep **26**(1): 25-8.

Touret, M., Sallanon-Moulin, M., Fages, C., Roudier, V., Didier-Bazes, M., Roussel, B., Tardy, M. et Jouvet, M. (1994). "Effects of modafinil-induced wakefulness on glutamine synthetase regulation in the rat brain." Brain Res Mol Brain Res **26**(1-2): 123-8.

Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H. et Guan, X. M. (1998). "Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain." FEBS Lett **438**(1-2): 71-5.

Trojanowski, J. Q. (1983). "Native and derivatized lectins for in vivo studies of neuronal connectivity and neuronal cell biology." J Neurosci Methods **9**(3): 185-204.

Tudor, M., Tudor, L. et Tudor, K. I. (2005). "[Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography]." Acta Med Croatica **59**(4): 307-13.

Tzavara, E. T., Bymaster, F. P., Felder, C. C., Wade, M., Gomeza, J., Wess, J., McKinzie, D. L. et Nomikos, G. G. (2003). "Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice." Mol Psychiatry **8**(7): 673-9.

Urade, Y., Eguchi, N., Qu, W. M., Sakata, M., Huang, Z. L., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S. et Hayaishi, O. (2003). "Sleep regulation in adenosine A2A receptor-deficient mice." Neurology **61**(11 Suppl 6): S94-6.

Urade, Y. et Hayaishi, O. (1999). "Prostaglandin D2 and sleep regulation." Biochim Biophys Acta **1436**(3): 606-15.

Urbain, N., Creamer, K. et Debonnel, G. (2006). "Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat." J Physiol.

Urbain, N., Gervasoni, D., Souliere, F., Lobo, L., Rentero, N., Windels, F., Astier, B., Savasta, M., Fort, P., Renaud, B., Luppi, P. H. et Chouvet, G. (2000). "Unrelated course of subthalamic nucleus and globus pallidus neuronal activities across vigilance states in the rat." Eur J Neurosci **12**(9): 3361-74.

Valatx, J. L. (1963). Ontogenèse des différents états de sommeil. Annequin, Edit. Lyon**:** 125.

Valatx, J. L. et Bugat, R. (1974). "[Genetic factors as determinants of the waking-sleep cycle in the mouse (author's transl)]." Brain Res **69**(2): 315-30.

Valatx, J. L., Bugat, R. et Jouvet, M. (1972). "Genetic studies of sleep in mice." Nature **238**(5361): 226-7.

Valatx, J. L., Cespuglio, R., Paut, L. et Bailey, D. W. (1980). "[Genetic study of paradoxical sleep in mice. Connection with coloration genes]." Waking Sleeping **4**(2): 175-83.

Valatx, J. L., Jouvet, D. et Jouvet, M. (1964). "Evolution électroencéphalographique des différents états de sommeil chez le chaton." Electroencephalography and Clinical Neurophysiology **7**: 218-233.

Van Bockstaele, E. J., Colago, E. E. et Valentino, R. J. (1998). "Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: substrate for the co-ordination of emotional and cognitive limbs of the stress response." J Neuroendocrinol **10**(10): 743-57.

Van Bockstaele, E. J., Peoples, J. et Telegan, P. (1999). "Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway." J Comp Neurol **412**(3): 410-28.

van den Pol, A. N. (1999). "Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord." J Neurosci **19**(8): 3171-82.

van den Pol, A. N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K. R. et Ghosh, P. K. (2004). "Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection." Neuron **42**(4): 635-52.

Vanderwolf, C. H. (1969). "Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **26**(4): 407-18.

Vanni-Mercier, G., Gigout, S., Debilly, G. et Lin, J. S. (2003). "Waking selective neurons in the posterior hypothalamus and their response to histamine H3-receptor ligands: an electrophysiological study in freely moving cats." Behav Brain Res **144**(1-2): 227-41.

Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J. S. et Jouvet, M. (1989). "Mapping of cholinoceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat." Arch Ital Biol **127**(3): 133-64.

Vazquez, J. et Baghdoyan, H. A. (2004). "GABAA receptors inhibit acetylcholine release in cat pontine reticular formation: implications for REM sleep regulation." J Neurophysiol **92**(4): 2198-206.

Velazquez-Moctezuma, J., Gillin, J. C. et Shiromani, P. J. (1989). "Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation." Brain Res **503**(1): 128-31.

Verret, L. (2005). Etude anatomo-fonctionnelle des reseaux neuronaux du sommeil paradoxal chez le rat. lyon, Université Claude Bernard, Lyon1**:** 235.

Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Leger, L. et Luppi, P. H. (2006). "Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat." J Comp Neurol **495**(5): 573-586.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C. et Luppi, P. H. (2003). "A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep." BMC Neurosci **4**(1): 19.

Verret, L., Leger, L., Fort, P. et Luppi, P. H. (2005). "Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery." Eur J Neurosci **21**(9): 2488-504.

Vertes, R. P. (1991). "A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat." J Comp Neurol **313**(4): 643-68.

Vertes, R. P. et Kocsis, B. (1994). "Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat." J Comp Neurol **340**(1): 11-26.

Vertes, R. P. et Siegel, J. M. (2005). "Time for the sleep community to take a critical look at the purported role of sleep in memory processing." Sleep **28**(10): 1228-9; discussion 1230-3.

Villablanca, J. (1974). Role of the thalamus in sleep: sleep-wakefulness in chronic diencephalic and athalamic cats. Basic sleep mechanisms. O. Petre-QuadensetSchlag, J. D. New York, Academic Press**:** 51-78.

Vincent, S. R., Satoh, K., Armstrong, D. M., Panula, P., Vale, W. et Fibiger, H. C. (1986). "Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat." Neuroscience **17**(1): 167-82.

Von economo, C. (1931). "Sleep as a problem of localization." j Nerv Mental Disease **71**: 249-69.

Vyazovskiy, V. V., Borbely, A. A. et Tobler, I. (2002). "Interhemispheric sleep EEG asymmetry in the rat is enhanced by sleep deprivation." J Neurophysiol **88**(5): 2280-6.

Vyazovskiy, V. V. et Tobler, I. (2005). "Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat." Brain Res **1050**(1-2): 64-71.

Wan, X. S., Liang, F., Moret, V., Wiesendanger, M. et Rouiller, E. M. (1992). "Mapping of the motor pathways in rats: c-fos induction by intracortical microstimulation of the motor cortex correlated with efferent connectivity of the site of cortical stimulation." Neuroscience **49**(4): 749-61.

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M. et Wada, H. (1984). "Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker." Brain Res **295**(1): 13-25.

Waterhouse, B. D., Lin, C. S., Burne, R. A. et Woodward, D. J. (1983). "The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus." J Comp Neurol **217**(4): 418-31.

Webster, H. H. et Jones, B. E. (1988). "Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states." Brain Res **458**(2): 285-302.

Wiklund, L., Leger, L. et Persson, M. (1981). "Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups." J Comp Neurol **203**(4): 613-47.

Wisor, J. P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G. H., Mignot, E. et Edgar, D. M. (2001). "Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness." J Neurosci **21**(5): 1787-94.

Woolf, N. J. et Butcher, L. L. (1986). "Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain." Brain Res Bull **16**(5): 603-37.

Wouterlood, F. G., Steinbusch, H. W., Luiten, P. G. et Bol, J. G. (1987). "Projection from the prefrontal cortex to histaminergic cell groups in the posterior hypothalamic region of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase." Brain Res **406**(1-2): 330-6.

Xi, M. C., Morales, F. R. et Chase, M. H. (1999). "Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism." J Neurophysiol **82**(4): 2015-9.

Yamada, M., Miyakawa, T., Duttaroy, A., Yamanaka, A., Moriguchi, T., Makita, R., Ogawa, M., Chou, C. J., Xia, B., Crawley, J. N., Felder, C. C., Deng, C. X. et Wess, J. (2001). "Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean." Nature **410**(6825): 207-12.

Yamamoto, K., Mamelak, A. N., Quattrochi, J. J. et Hobson, J. A. (1990). "A cholinoceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: locus of the sensitive region." Neuroscience **39**(2): 279-93.

Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J. L., Wang, Q. P., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S. et Sakurai, T. (2002). "Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor." Biochem Biophys Res Commun **290**(4): 1237-45.

Yoshida, K., McCormack, S., Espana, R. A., Crocker, A. et Scammell, T. E. (2006). "Afferents to the orexin neurons of the rat brain." J Comp Neurol **494**(5): 845-61.

ETUDE DES RESEAUX NEURONAUX RESPONSABLES DE LA REGULATION DU SOMMEIL PARADOXAL: Approche pluridisciplinaire chez le rongeur.

RESUME

L'objectif de notre étude est de mieux comprendre les réseaux neuronaux et les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation du sommeil paradoxal (SP). Pour ce faire, nous avons opté pour une approche expérimentale pluridisciplinaire, combinant les enregistrements polysomnographiques, l'électrophysiologie, la pharmacologie et la neuroanatomie fonctionnelle. Ainsi, nous avons mis en évidence une nouvelle population neuronale impliquée dans la régulation du SP : les neurones sunthétisant l'hormone de mélano-concentration (MCH) de l'hypothalamus postérieur. De plus, nous avons montré que ces neurones n'étaient pas régulés par des afférences GABAergiques inhibitrices, mais plus vraisemblablement par les neurotransmetteurs de l'EV. Nous avons également démontré que les neurones Hcrt, co-distribués au sein de l'HP avec les neurones MCH, sont eux inactifs durant le SP et sous le contrôle d'un tonus GABAergique inhibiteur durant cet état de vigilance.

Parallèlement, nous avons confirmé le rôle clé du noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal (DPGi) du bulbe rachidien dans la régulation du SP. En effet, le DPGi contient de nombreux neurones dont l'activité électrophysiologique est spécifique du SP. De plus, notre étude anatomique a mis en évidence les fortes relations entre le DPGi et de nombreuses structures impliquées dans la régulation du SP. Ainsi, le DPGi semble jouer un rôle central dans la genèse et le maintien de cet état de vigilance.

L'ensemble des données obtenues au cours de ce travail nous permet ainsi d'appréhender dans sa globalité les réseaux neuronaux à l'origine de la régulation du SP.

STUDIES OF THE NEURONAL NETWORKS RESPONSIBLE FOR PARADOXICAL SLEEP REGULATION: a multidisciplinary approach.

SUMMARY

The aim of our study is to better understand neuronal networks responsible for paradoxical sleep (PS) onset and maintenance. For this purpose, we used a multidisciplinary approach combining polygraphic recordings, electrophysiology, pharmacology and neuroanatomy. We found that neurons containing the melanin-concentrating hormone (MCH), exclusively located in the posterior hypothalamus, are critically involved in PS regulation. Besides, we showed that these neurons are not under a GABAergic inhibition during W and SWS, but are likely inhibited by classical waking neurotransmitters. In addition, we demonstrated that hypocretin neurons, intermingled within the posterior hypothalamus are silent during PS due to a GABAergic inhibitory tone.

Finally, we confirmed that the dorsal paragigantocellular reticular nucleus (DPGi) play a key role in PS regulation. Indeed, we recorded within the DPGi neurons specifically active during PS. Furthermore, we showed that DPGi is connected with various brain area already involved in PS regulation. These results therefore indicate that DPGi neurons might play a key role in PS onset and maintenance.

This investigation has led to new insights into the neuronal networks responsible for PS regulation.

DISCIPLINE: Neurosciences

MOTS-CLES: Sommeil Paradoxal, Rat, Electrophysiologie, Neuroanatomie, C-Fos.

CNRS UMR 5167
Laboratoire de physio-pathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil
Faculté de médecine R.T.H Laënnec – 7, rue Paradin
69372 LYON Cedex 08