Régulation du sommeil paradoxal en condition de stress : implication des projections corticales au noyau préoptique ventrolatéral

Mathilde Chouvaeff

▶ **To cite this version:**

Mathilde Chouvaeff. Régulation du sommeil paradoxal en condition de stress : implication des projections corticales au noyau préoptique ventrolatéral. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris sciences et lettres, 2024. Français. ⟨NNT : 2024UPSLS023⟩. ⟨tel-04833595⟩

HAL Id: tel-04833595

https://pastel.hal.science/tel-04833595v1

Submitted on 12 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée au Laboratoire Plasticité du Cerveau, ESPCI, CNRS UMR 8249

Régulation du sommeil paradoxal en conditions de stress : implication des projections corticales au noyau préoptique ventrolatéral

Soutenue par
Mathilde CHOUVAEFF
Le 17/10/2024

Ecole doctorale n° 158
Cerveau, cognition et comportement

Spécialité
Neurosciences

Composition du jury :

Daniela, POPA IBENS-PSL	*Examinatrice, Présidente*
Anita, LÜTHI Université de Lausanne	*Examinatrice*
Christelle, PEYRON CNRL, Université de Lyon	*Rapportrice*
Jacques, BARIK IPMC, Université côte d'Azur	*Rapporteur*
Karim, BENCHENANE ESPCI-PSL	*Co-encadrant de thèse*
Thierry, GALLOPIN ESPCI-PSL	*Directeur de thèse*

ESPCI PARIS | PSL

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres du jury : **Christelle Peyron, Jacques Barik, Anita Lüthi** et **Daniela Popa** pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'assister à ma soutenance. C'est un plaisir et un honneur. Je salue en particulier mes rapporteurs pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit ainsi que pour vos retours constructifs.

Je tiens ensuite à remercier **Thierry** d'avoir accepté d'être le directeur de mon travail de thèse. Après mon bref passage dans l'équipe pour un stage d'été, on s'était fait la promesse de se retrouver pour le master, et, qui sait, peut-être même pour la thèse !? Et c'est chose faite ! Je sais que tu n'aurais *a priori* pas parié tous tes chevaux sur moi à cause de mon manque de confiance et de mon parcours un peu atypique, mais j'espère que le travail que l'on a accompli ensemble ne te fait rien regretter ! Je te remercie sincèrement pour ta disponibilité, ton écoute et tes conseils qui m'ont guidé dans ce projet. Merci pour la confiance que tu m'as accordée dans les choix et la mise en place des manips, la co-supervision de quelques étudiants et l'enseignement de TP… Tout ça a contribué à me faire grandir et m'a bien armé pour la suite ! Merci également pour ta bonne humeur légendaire qui égaye le quotidien et tes encouragements qui boostent jusqu'à la dernière ligne droite !
Je remercie également **Karim** de m'avoir accepté dans l'équipe à plusieurs reprises et d'avoir co-supervisé ma thèse. En particulier, merci de m'avoir aidé à rebondir quand j'ai eu des frayeurs avec les datas ; se perdre avec toi dans les signaux bruts ou sur matlab m'a beaucoup appris. Et, plus globalement, merci de nous partager les grandes questions scientifiques (ou pas d'ailleurs) qui t'animent.

Je remercie également tous les membres de l'équipe MOBs qui m'ont accompagné pendant ces 4 années. **Sophie**, c'est par ton intermédiaire que j'ai fait mes tout premiers pas dans l'équipe en 2018. Je me souviens avoir renoncé à toutes mes vacances d'été pour continuer d'apprendre à tes côtés. C'était tellement enrichissant ! Tu es la petite mouche qui m'a piqué, tu m'as fait découvrir un monde que je n'ai plus voulu quitter. Merci pour ton aide infaillible et si précieuse tout au long de ma thèse. **Baptiste**, mon homologue masculin dans l'équipe, de nos débuts de M2 à la fin de thèse, on est passé dans les mêmes galères (ou presque). Moteur de l'équipe (que dis-je du labo !) tu animes nos réunions, déjeuners et pauses cafés de

débats sans fin et recrute toutes les nouvelles têtes pour les séances de *street workout*. À quand le concours de tractions ? **Antoine**, fervent défenseur des journal clubs et acolyte du REM sleep, tu as été d'une aide précieuse, en particulier cette dernière année. Juste et humain, j'ai trouvé en toi une oreille attentive. Merci pour tes conseils et ton coaching qui m'ont aidé à monter sur le ring ! **Alice**, mon petit poussin à l'enthousiasme débordant, t'encadrer a été un vrai plaisir. Devenue mon bras droit en cette fin de thèse, je te remercie sincèrement pour ton aide ; maintenant c'est toi qui tiens les rênes ! Tu as également été d'un grand soutien moral, une alliée qui me comprend en un regard. Merci ! **Chloé**, nouveau petit poussin *bis* à la motivation débordante et aux convictions fortes, ton envie de faire les choses bien t'emmènera loin ! Je remercie également les anciens de l'équipe, **Sam** et **Dima**, qui m'ont guidé dans mes débuts de thésarde ainsi que **Charles** et **Rudy**, les rescapés, qui ont largement contribué à la bonne ambiance dans l'équipe et dans tout le couloir. Merci aussi à tous les autres brillants cerveaux qui sont passés dans l'équipe et ont contribué à son effervescence : **Élisa**, **Pierre**, **Tom**, **Ella**, **Alexane**, **Mathieu**, **Basile**.

L'équipe MOBs fait partie d'un ensemble plus large. Aussi, je tiens à remercier **Thomas** et **Philippe** de faire de ce labo un lieu bienveillant et stimulant pour chacun d'entre nous. Merci pour votre aide. Je remercie également chaleureusement les petites fées du labo **Khanh**, **Hélène**, **Otilia** et **Émilie**, pour leur bonne humeur et leur efficacité à toutes épreuves qui nous rendent la vie tellement plus facile ! Je souhaite également exprimer ma gratitude à l'ensemble des LPCiens. La place me manque pour vous écrire à chacun quelques lignes, mais je vous remercie pour les petits mots échangés autour d'un café, au détour d'un couloir ou encore pendant les déjeuners surpeuplés dans la cuisine. Chacune de nos interactions a contribué à égayer mon quotidien.

À la team cantine, merci pour ces moments de détente, faits de potins et d'actualités en tout genre ! **Tinaïg**, pétillante et drôle, ton courage et ta motivation à toutes épreuves forcent l'admiration. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta carrière, tu le mérites ! **Maxime**, le joueur de quidditch (oui, je ne m'en remets toujours pas !) aux longs discours, mais toujours pavés de bons conseils. **Clément**, propagandiste pour la Suisse, drôle et bienveillant, merci pour ton soutien ici et outre-atlantique.

Petit aparté pour Marseille, là où la passion pour les neurosciences est devenue évidente. Je tiens à remercier chaleureusement **Pierre-Yves** pour son aide et parce qu'il est probablement celui qui a semé la petite graine « recherche » dans ma tête. Je te souhaite le meilleur au labo des Bisounours ! **Caliani**, douce baroudeuse à travers les facs de France, ta détermination force le respect. Je suis ravie que tu aies trouvé une thèse dans un labo et un domaine qui te conviennent. Même si nos chemins se croisent de plus en plus rarement, je chéri chacune de tes visites. Hâte de la prochaine !

Éléonore, camarade de promo en licence, alliée de révision pendant le master, aujourd'hui voisine de labo et amie. On en a parcouru du chemin ! Tu as été d'un soutien inébranlable pendant ces 6 dernières années et je t'en suis très reconnaissante. Merci pour ton aide et tes conseils avisés chaque fois que j'en ai eu besoin ; tu as été mon pilier dans cette thèse. Mais l'histoire ne s'arrête pas au labo : également acolyte de musées, partenaire dans l'indécision (ce qui nous a souvent amenés à flâner indéfiniment à la recherche d'un endroit pour manger une crêpe et finalement toujours retourner à la même adresse !?), ma plus grande confidente (voire ma psy !), la liste est longue… J'ai découvert en toi une personne humaine, sincère et bienveillante dont la curiosité et le désir de comprendre les choses en profondeur ont plus d'une fois élargi mes horizons. Tu as amené beaucoup de couleurs dans ma vie, littéralement ! Au fil du temps, je t'ai vu prendre confiance en toi, en qui tu es et en tes choix. Ne laisse personne te faire douter. Tu as brillé pendant ta thèse et je te souhaite de briller tout autant dans ce nouveau chapitre qui s'ouvre !

Je tiens également à remercier tous mes Antreblocoeurs qui ont suivi de près ou de loin mes péripéties de labo. En effet, même si grimper est définitivement devenu mon exutoire, ce sont surtout les jolies rencontres que j'ai faites au pied des blocs (ou sur la terrasse autour d'un café-bière) qui ont été d'un soutien inestimable et qui ont contribué à adoucir mon quotidien.
Tout d'abord, un gros merci à **Lylou**, le bébou et coach des premiers jours, qui m'a initiée et introduite au noyau dur d'AB. Merci pour les encouragements tant en escalade que pendant ma thèse. Continues de t'épanouir dans ta voie ! **Rouliette**, mon acolyte de grimpe rapidement devenue une véritable amie, tu es sans aucun doute une de mes plus belles rencontres de ces 4 dernières années. Tu as été d'un soutien à toutes épreuves ! Merci d'avoir été là pour célébrer chacune de mes petites victoires et d'avoir toujours eu un mot juste pour m'encourager, me rassurer et me redonner confiance dans les moments de doute. Les mots

me manquent pour décrire à quel point tu m'es précieuse. Merci pour ton écoute sans faille et tes conseils avisés. Tu as fait partie de cette thèse, et pas seulement parce que tu en as lu chaque mot (à l'espace et la virgule près). **Mouflax**, un distributeur d'amour ambulant coiffé d'une couronne fleurie, merci pour les moments de partage, ton écoute et ta bienveillance en toutes circonstances. **Martouf**, la petite lumière qui nous guide dans chacune de nos aventures avec ses cartes et son bâton. La légende dit que ses incantations vous feraient réussir n'importe lequel de vos projets ! Merci d'être là. Et merci à vous deux pour les dimanches jeux qui réchauffent le coeur et rendent chaque début de semaine moins amer. **Gaby**, Gaby, Gaby, Gaby, Gaby, Gaby ! Derrière ta nonchalance légendaire se cache un petit nounours toujours présent pour ses amis. Merci pour tous les délires et les moments de complicité (par contre sors de ma tête GabrielE quand même !). **Pépé**, semeuse de chaussettes toujours prête à dégainer une boule à facettes ! Ta présence est apaisante et met des paillettes dans ma vie, littéralement. **Salomé**, partager nos anecdotes de thésardes m'a souvent aidé à relativiser. Reste forte, c'est bientôt la fin pour toi aussi ! **Jo**, entre déhanchés *caliente* et câlinous douillets, tu comptes parmi mes premières rencontres à AB, toujours présent et réconfortant. **Chris**, copain boulimique de bloc aux méthodes parfois farfelues. **Momo**, le rayon de soleil à la joie communicative et aux 1000 anecdotes. Et merci à tous les autres, **Elsa**, **Mathilde**, **Justine**, **Astryd**, **Charly**, **Laïla**, **Kris** et **Célestine** (mention spéciale pour les conseils d'une thésarde expérimentée) pour les petits moments de vie et/ou les nombreuses escapades bleausardes (ou ailleurs). À nos prochaines aventures !

Jo, je te remercie pour ta patience infinie. Tu as été mon plus grand soutien dans cette aventure et tu l'as rendue plus facile. Ta présence est source de sérénité et de réconfort, et tes encouragements m'ont rendue plus forte. Merci pour ce que tu m'apportes au quotidien, je te dois beaucoup !

Je tiens également à dire un grand merci à ma famille pour leur soutien dans chacun de mes choix et leur implication tout au long de mes études. Merci de m'avoir écouté (ou d'avoir fait semblant ?) lors des innombrables répétitions de mes oraux de master ou de l'école doctorale. **Papa**, merci pour tes boutades à tour de bras qui aident à dédramatiser et à rire de n'importe quelle situation. **Maman**, merci pour ta tendresse et tes petites attentions qui soignent tous les maux. **Binou**, ma cops de toujours, ma partenaire de bêtises et la cause de mes plus gros

fou-rires. Je ne comprends toujours pas comment un si petit corps peut contenir autant d'amour. Savoir que tu es fière de moi est ma plus grande fierté. *Kiss kiss love.*

Pour finir, je souhaite saluer mon armée de Minions pour avoir pris le temps de relire et corriger ce manuscrit. **Rouliette**, je l'ai déjà mentionné, mais ton investissement et ta ténacité à lire chaque mot d'un jargon qui ne t'était pas familier m'ont impressionné (et beaucoup touché) ! **Justine**, malgré ta vie à 100 à l'heure, tu as pris le temps de me relire. Merci pour tes blagues qui ont rendu la finalisation de ce manuscrit plus légère ! **Pépé**, merci pour tes commentaires bienveillants et ta curiosité ! Merci également à **Éric**, Minion en chef (je suis sûre qu'il en sera ravi), pour les impressions de ce manuscrit.

Tables des matières

Liste des abréviations 11

Préface 13

Introduction 15

Chapitre 1 : Le sommeil 17

1.1 La physiologie du sommeil 17

1.1.1 Définition et fonctions du sommeil 17

1.1.2 Caractérisation des états de vigilance 19

1.1.3 Régulation du sommeil : cycle, homéostasie et rythme circadien 21

1.1.4 Les oscillations du sommeil 24

1.2 Les circuits neuronaux responsables des états de vigilance 27

1.2.1 Les circuits responsables de l'éveil 27

1.2.2 Les circuits responsables du sommeil lent 32

1.2.3 Les circuits responsables du sommeil paradoxal 36

1.3 Mécanismes à l'origine de l'alternance entre les états de sommeil 42

1.3.1 Modèles basés sur l'interaction entre deux populations antagonistes ... 42

1.3.2 Modèles basés sur l'auto-régulation du sommeil paradoxal 45

Chapitre 2 : Le stress 49

2.1 Mécanismes de la réponse au stress 49

2.1.1 Historique et définition du stress 49

2.1.2 Activation de l'axe sympatho-surrénalien et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien 51

2.1.3 Production d'une réponse adaptée 53

2.2 Effets du stress sur le sommeil 54

2.2.1 Effets d'un stress aigu versus chronique 54

2.2.2 Influence de divers paramètres (contrôlabilité, prédictibilité) 56

2.2.3 Le cas particulier de la défaite sociale 58

Chapitre 3 : Vers un lien entre stress et sommeil : implication de la voie reliant le cortex préfrontal au noyau préoptique ventrolatéral 63

3.1 Le noyau préoptique ventrolatéral : une structure clé du sommeil 63

3.1.1 Découverte du VLPO comme structure clé du sommeil 63

3.1.2 Diversité cellulaire et connectivité du VLPO 65

3.1.3 Rôle du VLPO dans la mise en place du sommeil....68

3.1.4 VLPO et régulation du sommeil paradoxal....69

3.2 Le cortex préfrontal : un lien entre stress et sommeil....71

3.2.1 Organisation anatomique générale du PFC....71

3.2.2 Connectivité du PFC : un hub entre stress et sommeil....72

3.2.3 Rôle du PFC dans la régulation du sommeil....74

3.2.4 Rôle du PFC dans la régulation du stress....75

Résultats....77

Chapitre 4 : Publication scientifique (soumise)(en anglais) : A top down control for stress-induced REM sleep fragmentation....79

Chapitre 5 : Le rôle des neurones du VLPO exprimant la corticolibérine (CRH) dans la régulation du sommeil paradoxal....139

Chapitre 6 : Automatisation de la classification du sommeil paradoxal....155

Chapitre 7 : Discussion générale....171

7.1 Considérations méthodologiques : l'importance d'une classification objective des états de sommeil....172

7.2 Vers un rôle physiologique de la fragmentation du sommeil paradoxal induite par la voie PFC-VLPO en condition de stress ?....173

7.2.1 Rôle physiologique de la fragmentation du sommeil paradoxal en condition de stress....173

7.2.2 Évaluer l'importance de la voie PFC-VLPO....176

7.2.3 Intégration de la voie PFC-VLPO dans les circuits de régulation du sommeil paradoxal....176

7.3 Les neurones CRH du VLPO comme effecteurs de la voie PFC-VLPO dans la fragmentation du sommeil paradoxal....177

7.4 Potentielle implication du peptide CRH dans les effets du stress sur le sommeil paradoxal....179

7.5 Fragmentation du sommeil paradoxal et maladies psychiatriques....180

Conclusion générale....181

Bibliographie....183

Annexes....213

Liste des abréviations

AAV	Virus adéno-associé
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
BLA	Amygdale basolatérale
CA1/3	Corne d'Ammon
CCK	Cholécystokinine
CNO	Clozapine N-oxide
CRH	Corticolibérine
DA	Dopamine
DR	Raphé dorsal
DREADD	*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*
EEG	Électroencéphalogramme
EMG	Électromyogramme
EOG	Électro-oculogramme
EPM	Labyrinthe en croix surélevé (*Elevated-plus-mazz)*
eVLPO	Noyau préoptique ventrolatéral étendu
Gal	Galanine
GiV	Noyau gigantocellulaire ventral
HPA	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HPC	Hippocampe
IL	Cortex infralimbique
KO	*Knock out*
LC	Locus coeruleus
LDT	Noyau du tegmentum latérodorsal
LFP	Potentiel de champ local
LH	Hypothalamus latéral
LTS	Potentiel à bas seuil *(Low-threshold spike)*
MCH	Hormone de concentration de mélanine
NA	Noradrénaline
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NRT	Noyau réticulé thalamique

OB	Bulbe olfactif
ORX	Orexine
PFC	Cortex préfrontal
PL	Cortex prélimbique
POA	Région préoptique
PPSI/E	Potentiel post-synaptique inhibiteur/excitateur
PPT	Noyau du tegmentum pédonculopontin
PVN	Noyau paraventriculaire
SAM	Axe sympatho-surrénalien
SDS	Stress par défaite sociale
SL	Sommeil lent
SLD	Noyau sublatérodorsal
SP	Sommeil paradoxal
PVN	Noyau paraventriculaire
PZ	Zone parafaciale
SWR	*Sharp-wave ripples*
TAC1	Tachykinine 1
TMN	Noyau tubéromamillaire
vlPAG	Substance grise périaqueducale ventrolatérale
VLPO	Noyau préoptique ventrolatéral
vM	Medulla ventrale
VTA	Aire tegmentale ventrale

Préface

Le sommeil est essentiel à la survie. C'est un processus hautement conservé à travers l'évolution qui occupe une grande part de la vie ; près d'un tiers chez l'homme. La place importante qu'il représente plaide en faveur d'une fonction physiologique primordiale qui ne pourrait pas être réalisée pendant l'éveil. Toutefois, la survie d'un individu dépend aussi grandement de sa capacité à faire face aux dangers de l'environnement. La vision classique des effets du stress sur le sommeil est d'augmenter la vigilance pour pouvoir réagir ; par exemple, fuir à l'approche d'un prédateur. Néanmoins, cette augmentation de la vigilance, bien qu'efficace, interfère avec le rôle protecteur du sommeil pour l'intégrité de l'organisme. D'ailleurs, on sait qu'un stress suffisamment intense ou prolongé dans le temps peut conduire à des pathologies, comme les troubles de l'anxiété, la dépression et les troubles de stress post-traumatiques. De manière intéressante, l'ensemble de ces pathologies est associé à d'importants troubles du sommeil, tels que l'augmentation du temps d'endormissement, un sommeil moins profond ou encore une fragmentation. Finalement, ces observations mettent en évidence qu'il existe une interaction complexe entre stress et sommeil qui peut induire des changements plus subtils dans l'architecture du sommeil en réponse au stress.

Face à cette interaction complexe, il est crucial de comprendre les mécanismes sous-jacents aux modifications du sommeil induites par le stress. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, visant à identifier ces mécanismes spécifiques. J'ai donc tenté de (1) mieux caractériser les effets d'un stress par défaite sociale sur le sommeil, (2) identifier des structures cérébrales responsables des modifications du sommeil induites par le stress, et enfin (3) définir le rôle de ces structures dans la régulation des effets du stress sur le sommeil.

L'introduction de ce manuscrit commencera par définir les différents stades de sommeil à travers leurs principales caractéristiques électrophysiologiques. Je présenterai les vastes réseaux à l'origine de la mise en place de chacun de ces états ainsi que les mécanismes permettant leur orchestration au cours d'une nuit de sommeil (Chapitre 1). Ensuite, je définirai ce qu'est le stress et comment cette réaction physiologique se manifeste chez un individu (Chapitre 2). Plus spécifiquement, je détaillerai les effets du stress sur le sommeil selon différents paramètres du facteur stressant, avec un accent particulier sur l'impact d'un

stress dit « social » sur le sommeil. La dernière partie de l'introduction abordera un substrat neuronal possible du lien entre stress et sommeil (Chapitre 3). Dans cette partie, je présenterai deux structures qui ont joué un rôle central dans ma thèse : le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO), un incontournable centre du sommeil, et le cortex préfrontal (PFC), une structure de haut niveau impliquée à la fois dans la régulation du stress et du sommeil. La partie de résultats de ce manuscrit s'organise autour de trois axes. Le premier axe présentera la publication soumise issue de mes travaux de thèse (Chapitre 4). Elle se concentre sur le rôle de la voie reliant le PFC au VLPO dans la régulation du sommeil paradoxal après un stress. Le second axe détaillera le rôle d'une des sous-populations neuronales du VLPO dans la régulation du sommeil paradoxal (Chapitre 5). Le dernier axe constitue une partie davantage méthodologique issue d'une question omniprésente tout au long de ma thèse : comment « bien » classifier le sommeil paradoxal ? (Chapitre 6). Dans une dernière partie, je discuterai de manière plus générale l'ensemble de mes résultats de thèse à la lumière de données expérimentales issues de la littérature (Chapitre 7).

Introduction

Chapitre 1 : Le sommeil

Le sommeil a été au centre de mes travaux de thèse. J'ai abordé une question fondamentale : comment et par quels mécanismes le sommeil est-il influencé par le stress ? Avant de pouvoir explorer ces interactions complexes, il est primordial de comprendre la régulation du sommeil dans des conditions « normales ». Ainsi, ce chapitre débutera par une définition précise du sommeil. Puis, je détaillerai l'ensemble des structures cérébrales qui régissent chacun des états de sommeil et de l'éveil. Enfin, j'aborderai les mécanismes permettant l'alternance des états de sommeil au cours de la nuit.

1.1 La physiologie du sommeil

1.1.1 Définition et fonctions du sommeil

Le sommeil est présent chez la plupart des espèces, notamment les insectes, les poissons, les oiseaux et les mammifères. Il se caractérise par un état de repos durant lequel l'individu présente une réactivité sensorielle réduite qui le distingue d'un état d'immobilité au cours de l'éveil. C'est également un état rapidement réversible qui le distingue de l'hibernation, l'anesthésie ou le coma (Siegel, 2008).

Historiquement, le sommeil était considéré comme un état passif avec une mise au repos du cerveau. Cependant, les travaux du neurologue autrichien Von Economo dans les années 1930 ont révélé qu'il s'agit en réalité d'un phénomène actif nécessitant l'activité de plusieurs structures cérébrales (Von Economo, 1930). Plus tard, dans les années 1960, Michel Jouvet a approfondi cette compréhension en montrant l'implication de circuits neuronaux complexes dans la régulation d'un second état de sommeil : le sommeil paradoxal (Jouvet, 1962). Aujourd'hui, ces circuits continuent d'être étudiés et précisés, témoignant de la complexité et de l'importance des mécanismes sous-jacents au sommeil.

Le sommeil est un phénomène qui se répète de manière régulière chaque nuit et alterne avec l'éveil le jour (pour les mammifères diurnes). En effet, le sommeil est finement régulé grâce à une horloge interne qui obéit aux rythmes circadiens (cycle de 24 h). De plus, un déficit de sommeil se traduit par une augmentation ultérieure du temps et/ou de la profondeur du sommeil, c'est ce qu'on appelle l'homéostasie du sommeil. Cette réponse à la privation de sommeil illustre bien son importance.

La forte conservation du sommeil chez la plupart des espèces, malgré des contraintes environnementales parfois très fortes, est un autre argument en faveur de son importance. En effet, le sommeil empêche la réalisation des actions essentielles à la survie comme la recherche de nourriture et de partenaire ainsi que la fuite de prédateurs. Ceci met en évidence le rôle clé du sommeil dans certaines fonctions qui semblent ne pas pouvoir être remplies durant l'éveil.

Une approche permettant de mieux comprendre le rôle du sommeil est d'étudier les dérèglements induits par son absence. Chez le rat, il a été montré qu'une privation de sommeil provoque une perte de poids, une dérégulation de la température corporelle ou encore une forte vulnérabilité aux infections. Dans des cas plus extrêmes, une privation de sommeil de plusieurs jours peut conduire à la mort (Everson, 1995). Chez l'homme, comme chez le rongeur, la réduction du temps de sommeil a également des effets délétères sur les processus cognitifs tels que l'attention, mais également sur les émotions et la perception sensorielle (Killgore, 2010 ; McCoy et Strecker, 2011).

Une des fonctions du sommeil les plus communément admises est son rôle dans la consolidation de la mémoire (Diekelmann et Born, 2010 ; Peigneux et al., 2001 ; Rasch et Born, 2013 ; Tononi et Cirelli, 2014). En effet, suite à une tâche d'apprentissage, on retrouve une forte densité d'oscillations à haute fréquence dans l'hippocampe (HPC), nommées *sharp-wave ripples* (Stickgold, 2005 ; Rasch et Born, 2013) qui ont été causalement impliquées dans la consolidation de la mémoire puisque leur suppression induit des déficits de mémoire spatiale (Girardeau et al., 2009).

Il a également été proposé que le sommeil joue un rôle clé dans l'élimination des déchets métaboliques du cerveau. En effet, pendant le sommeil l'espace interstitiel entre les cellules augmente, facilitant ainsi la circulation du liquide cérébro-spinal permettant une élimination jusqu'à deux fois plus rapide que lors de l'éveil (Xie et al,. 2013).

Le sommeil semble également exercer une fonction endocrinienne. Par exemple, il est impliqué dans la régulation et la sécrétion de plusieurs hormones, dont la prolactine et l'hormone de croissance (Sassin et al., 1969 ; Spiegel et al., 1994).

De plus, plusieurs études indiquent que le sommeil ou l'insomnie affectent le système immunitaire (Imeri et Opp, 2009 ; Besedovsky et al., 2012). En effet, la privation de sommeil augmente les risques d'observer de nombreuses pathologies (Tasali et al., 2008 ; Baracchi et Opp, 2009 ; Grandner et al., 2010). Il a également été montré que le sommeil facilite la restauration des tissus et la réparation des blessures (Adam et Oswald, 1977).

Finalement, la difficulté à répondre simplement à la question de la fonction du sommeil réside probablement dans la diversité des rôles qu'il semble jouer. De manière générale, le sommeil est crucial pour le bon fonctionnement de l'organisme.

1.1.2 Caractérisation des états de vigilance

L'invention de l'EEG par Hans Berger (Berger, 1929) a rendu possible l'enregistrement de l'activité électrique du cerveau au cours des différents états de vigilance. Ce nouvel outil de mesure a permis une évaluation plus objective des états de sommeil qui était jusqu'alors purement comportementale. Par la suite, les travaux de l'équipe de Loomis ont permis d'établir les premières classifications sur la base de rythmes caractéristiques tels que le rythme alpha ou les complexes K (Loomis et al., 1936 et 1938). Cette classification distingue les phases d'endormissement, de sommeil léger et de sommeil profond. Elle est encore en partie utilisée aujourd'hui. L'enregistrement d'autres variables physiologiques, telles que l'activité musculaire (EMG) et oculaire (EOG), associé à l'EEG, permet de distinguer sans ambiguïté les différents états de vigilance.

L'éveil

Pendant l'éveil, l'individu interagit avec son environnement et peut s'engager dans des comportements dirigés vers un but. D'un point de vue physiologique, l'éveil s'accompagne d'un tonus musculaire qui est fonction de l'activité motrice exercée par l'individu. Le rythme cardiaque et la fréquence respiratoire sont élevés. L'EEG pendant l'éveil se caractérise par une activité désynchronisée de faible amplitude et de haute fréquence (Figure 1.1A). Chez les rongeurs, on distingue l'éveil actif, caractérisé par des oscillations thêta (5 à 9 Hz) et gamma (30 à 150 Hz), de l'éveil calme, caractérisé par des oscillations de basse fréquence (<10 Hz) et de faible amplitude.

Le sommeil lent

Pendant le sommeil lent, l'individu devient, d'un point de vue comportemental, calme et moins sensible à son environnement. L'entrée en sommeil lent s'établit généralement à un endroit précis de l'environnement (nid ou lit) et s'accompagne d'une diminution (par rapport à l'éveil) de la température corporelle et du cerveau ainsi qu'une diminution du tonus musculaire. Les rythmes respiratoires et cardiaques sont plus faibles et réguliers.

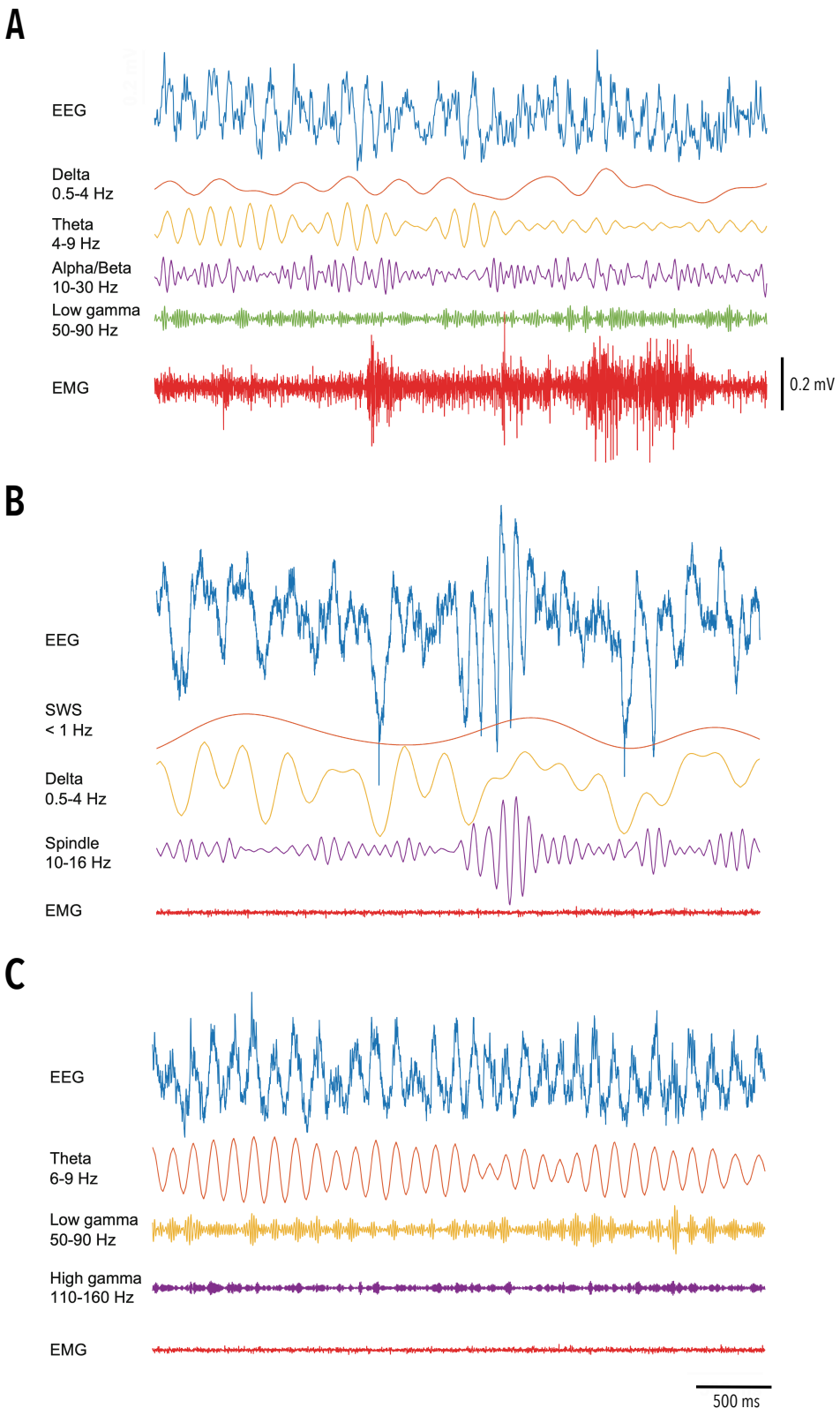


Figure 1.1. Caractérisation électrophysiologique des états de vigilance chez la souris
Tracé électromyographique (EMG, *en rouge*) et tracé électroencéphalographique (EEG, *en bleu*) illustrant les différentes oscillations caractéristiques des états de vigilance (*autres couleurs*) : éveil (**A**), sommeil lent (**B**) et sommeil paradoxal (**C**). *Adapté de Adamantidis et Lüthi, 2018.*

D'un point de vue EEG, le sommeil lent se caractérise par une activité dite synchronisée, de large amplitude et de basse fréquence (Figure 1.1B), qui inclut des oscillations lentes et des ondes delta (0.5 à 4.5 Hz). On retrouve également des fuseaux de sommeil ou spindles (11-15 Hz, 0.5–2 s) et des *sharp wave-ripples* (100-250 Hz, 50–100 ms, SWR) en provenance de l'hippocampe. L'ensemble des patterns oscillatoires mentionnés seront détaillés dans la section 1.1.4.

Le sommeil paradoxal

Le sommeil paradoxal, également connu sous le nom de sommeil REM (de l'anglais Rapid Eye Movements), a été mis en évidence chez l'homme, par William C. Dement et Nathaniel Kleitman, qui l'associent aux rêves (Dement et Kleitman, 1957). En parallèle, il est également observé chez le chat par l'équipe de Michel Jouvet (Jouvet et al., 1959). Contrairement au sommeil lent, le sommeil paradoxal se caractérise par une activité EEG similaire à l'éveil (désynchronisée) mais avec une forte prédominance d'oscillations thêta (5-9 Hz, Jouvet et al., 1959) (Figure 1.1C). Cette activité cérébrale est accompagnée d'une atonie musculaire quasi totale (à l'exception des muscles cardiaques, ventilatoires et oculaires). D'un point de vue physiologique, le sommeil paradoxal se caractérise également par des rythmes respiratoires et cardiaques irréguliers. Des événements phasiques peuvent aussi être observés au cours du sommeil paradoxal : il s'agit de brèves secousses musculaires au niveau de l'extrémité des membres ou des muscles de la face. C'est également au cours de ces événements phasiques que les saccades oculaires (ou Rapid Eye Movements en anglais) peuvent être observées.

1.1.3 Régulation du sommeil : cycle, homéostasie et rythme circadien

L'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal n'apparaissent pas de manière complètement aléatoire ; au contraire, chaque état se met en place selon une dynamique temporelle finement régulée. Différents facteurs liés à la physiologie interne d'un individu ou à son environnement peuvent influencer leur organisation. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'alternance entre les états de vigilance est notamment soumise aux rythmes circadiens et à la pression homéostatique. Ces deux facteurs ont été résumés dans un modèle proposé par Borbély en 1982 qui permet d'expliquer la rythmicité veille-sommeil (Figure 1.2).

Le *two-process model*

Pour garantir une organisation temporelle aussi bien rodée, plusieurs processus sont mis en jeu. Ils ont été résumés dans un modèle proposé par Borbély en 1982 : le *two-process model* (Borbely, 1982). Ce modèle prend en compte deux processus principaux et indissociables : le processus circadien (C) et le processus homéostatique (S) qui vont influencer la probabilité qu'un individu s'endorme ou reste éveillé (Figure 1.2). Il propose que le processus homéostatique S augmente pendant l'éveil, autrement dit, plus l'individu reste éveillé, plus la pression de sommeil est forte. Le processus S atteint finalement un seuil haut (T1) qui promeut alors le sommeil. À l'inverse, pendant le sommeil, le processus homéostatique S diminue jusqu'à atteindre un seuil bas (T2) qui promeut l'éveil. Le processus circadien C s'ajoute afin de moduler les seuils haut (T1) et bas (T2). Ainsi, dans certains cas, même lorsque la pression homéostatique est forte, si le processus C ne le permet pas, l'individu ne dormira pas.

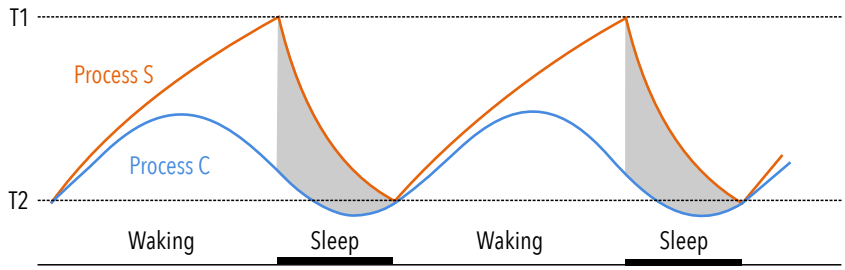


Figure 1.2. Le *two-process model* (Borbely, 1982)
L'alternance veille-sommeil est régulée par l'interaction entre deux processus : un processus homéostatique (S) et un processus circadien (C). Le processus S s'accumule durant l'éveil jusqu'au seuil haut (T1) qui déclenche le sommeil. Pendant le sommeil, le processus S diminue jusqu'au seuil bas (T2) entraînant le retour à l'éveil. Le processus C module les seuils au cours de la journée. *Adapté de Borbely, 1982.*

Ce modèle a été confronté aux résultats de différentes expériences (Daan et al., 1984). Par exemple, la restriction de sommeil, qui, par conséquent, prolonge les périodes d'éveil, entraîne une augmentation du seuil. Ce phénomène explique l'allongement de la durée du sommeil suivant. À l'inverse, le repos forcé (sieste par exemple) entraîne une diminution du seuil et explique alors la fragmentation du sommeil qui suit.

Ce modèle offre une explication sur les mécanismes à l'origine de l'alternance entre les états de sommeil et d'éveil. En revanche, une de ses limites est qu'il ne prend pas en considération les mécanismes permettant l'alternance entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal.

Le cycle de sommeil

Comme le pointe très justement la principale critique du modèle proposé par Borbély, le sommeil n'est pas un seul et même état homogène. En effet, les deux sous-stades de sommeil, lent et paradoxal, ont été identifiés chez la plupart des espèces (Anafi et al., 2019). La combinaison de ces deux états de sommeil a permis de définir les cycles de sommeil ou cycles ultradiens. Un cycle commence par un épisode de sommeil lent et se termine par un épisode de sommeil paradoxal. Chez l'homme, un cycle dure en moyenne 90 minutes et on en retrouve 4-5 par nuit (Figure 1.3B). À l'inverse, chez les rongeurs, les cycles sont beaucoup plus courts (de l'ordre de quelques minutes) et nombreux ; on parle de sommeil polyphasique (Figure 1.3A).

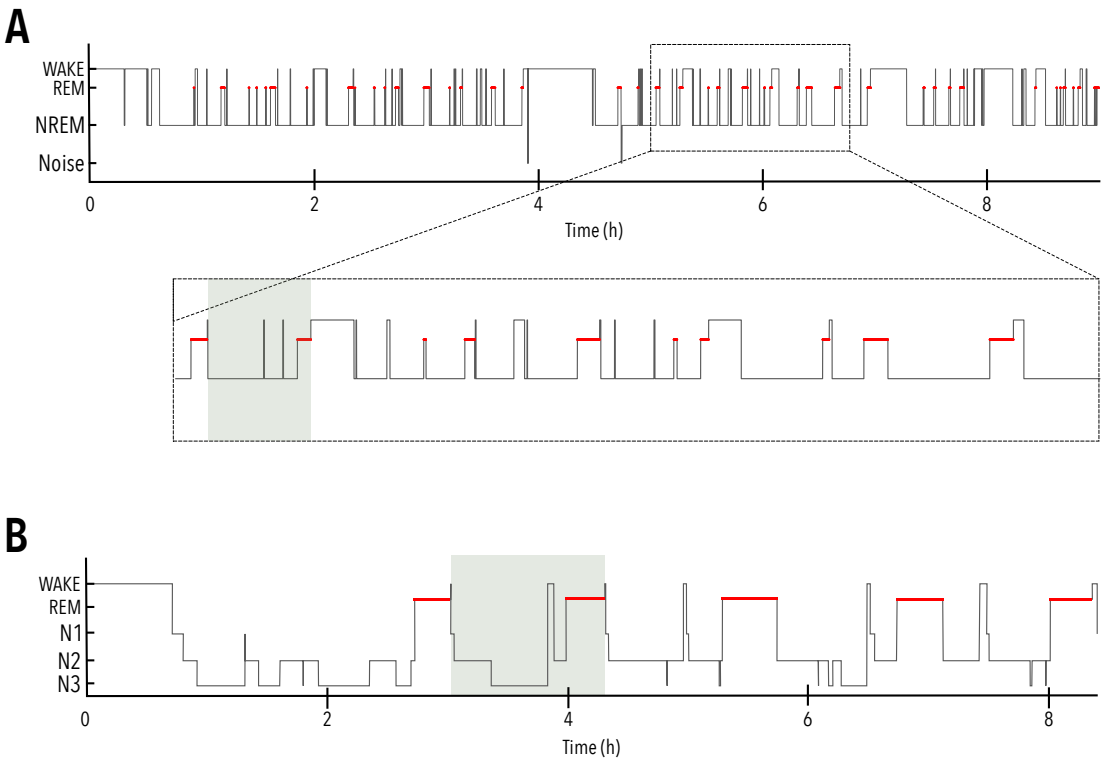


Figure 1.3. Architecture du sommeil chez l'homme et le rongeur
Hypnogramme d'une session de sommeil chez la souris (**A**) et d'une nuit de sommeil chez l'homme (**B**). Pour chaque espèce, un cycle de sommeil est mis en évidence par un rectangle vert.

L'organisation temporelle des états de sommeil suit donc une structure précise durant la nuit qui requiert également une dynamique temporelle bien rodée qui sera davantage détaillée dans la section 1.3.

1.1.4 Les oscillations du sommeil

Nous avons brièvement mentionné la présence de différents patterns oscillatoires qui apparaissent au cours de chacun des états de vigilance et permettent notamment de les définir. Dans cette section, nous ferons une revue non exhaustive des principales oscillations ainsi qu'une brève explication des mécanismes qui les génèrent.

Les oscillations du sommeil lent

Les **oscillations lentes** peuvent être observées dans les structures thalamo-corticales et reflètent la variation des potentiels membranaires des neurones qui alternent entre des états dépolarisés et hyperpolarisés. Pendant les états dépolarisés, ces neurones présentent une forte activité synaptique qui conduit au déclenchement de nombreux potentiels d'action. À l'inverse, pendant l'état hyperpolarisé, ces neurones sont silencieux. C'est l'alternance entre ces deux états qui conduit aux rythmes lents (<1 Hz). En effet, ce phénomène d'alternance entre les périodes de silence et les périodes de forte activité produit des modifications visibles sur les enregistrements EEG qui se manifestent par de grandes déflexions. Pendant les périodes de silence neuronal, la déflexion enregistrée dans les couches profondes du cortex est positive alors qu'elle est négative dans les couches plus superficielles, traduisant la présence d'un dipôle (Contreras et Steriade, 1995).

Parmi les ondes lentes, on distingue également les **ondes delta** (1-4,5 Hz) (Figure 1.4c) qui sont particulièrement présentes pendant les stades de sommeil profond. Deux mécanismes expliquant leur origine ont été proposés : un au niveau du thalamus, l'autre au niveau du cortex (Lőrincz et al., 2015). Au niveau du thalamus, il a été suggéré que l'hyperpolarisation de la membrane induit un courant cationique (I_h) à l'origine d'une forte conductance sodique qui conduit à la dépolarisation progressive de la membrane. Cette dépolarisation induit, à son tour, l'ouverture de canaux calciques de type T permettant l'activation de courants calciques à bas seuil qui entraînent donc des potentiels calciques à bas seuil (ou LTS de l'anglais *low threshold spike*). D'autre part, les neurones corticaux de la couche 5 présentent une oscillation delta intrinsèque (Steriade et al., 1993). Il n'est pas clair de savoir lequel de ces deux

mécanismes est le plus important dans la genèse des ondes delta ; toutefois, il a été montré que l'inhibition optogénétique des neurones du thalamus induit une diminution de l'amplitude des oscillations delta au niveau du cortex (Gent et al., 2018), suggérant que le thalamus joue un rôle moteur (Adamantidis et al., 2019).

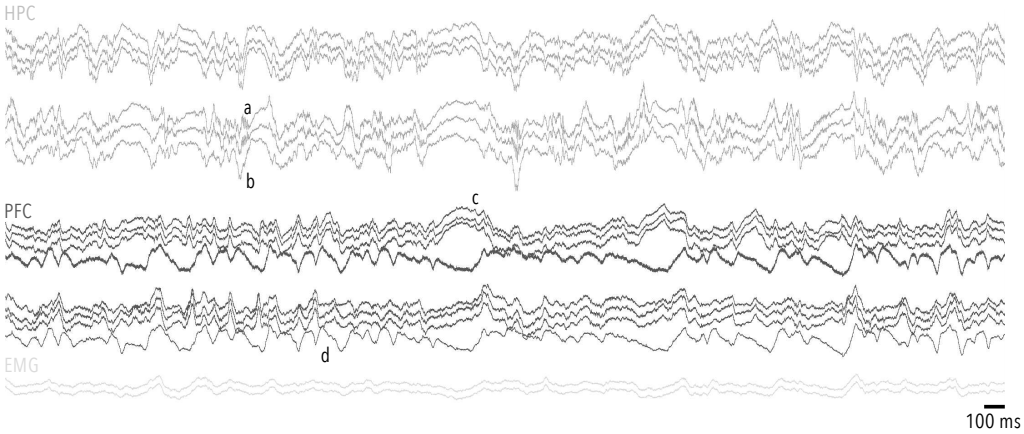


Figure 1.4. Les oscillations associées au sommeil chez le rongeur
Exemple d'un enregistrement par potentiels de champs locaux réalisé chez la souris, grâce à des électrodes intracérébrales placées dans l'hippocampe (HPC, *en haut*) et le cortex préfrontal (PFC, *au milieu*). Un EMG est également placé au niveau des muscles de la nuque (*en bas*). L'extrait de l'enregistrement montre une période de sommeil lent dans laquelle il est possible d'observer des *ripples* (**a**) et des *sharp waves* (**b**) dans l'HPC, ainsi que des ondes delta (**c**) et des *spindles* (**d**) dans le PFC.

Les ***spindles*** **(ou fuseaux de sommeil)** (Figure 1.4d) se caractérisent par des cycles oscillatoires allant de 10 à 20 Hz avec une amplitude variable (Loomis et al., 1935). Les spindles mettent en jeu différentes populations de neurones qui forment la boucle thalamo-corticale (Steriade, 2006). Parmi elles, on retrouve les neurones thalamo-corticaux qui sont de nature glutamatergique et les neurones du noyau réticulé thalamique (NRT) qui sont de nature GABAergique. Le mécanisme le plus accepté pour expliquer cette oscillation est le suivant : les neurones du NRT déchargent des bouffées de potentiels d'action qui induisent des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) dans les neurones thalamo-corticaux. À la suite de ces PPSI, les neurones thalamo-corticaux génèrent des bouffées de potentiel d'action par rebond qui vont exciter les neurones du NRT. La nouvelle bouffée qui sera générée démarre alors le cycle oscillatoire suivant (McCormick et Bal, 1997).
Contrairement aux rythmes lents et aux spindles, les ***sharp wave-ripples (SWR)*** ne peuvent être observées que grâce à l'implantation d'électrodes intra-cérébrales dans la couche

pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe. Ces événements se caractérisent par de grandes déflexions (*sharp waves*) (Figure 1.4b) avec la superposition d'une oscillation très rapide au pic (*ripples*) (Figure 1.4a). Principalement observées pendant le sommeil lent, les SWRs ont également été rapportées pendant les comportements d'immobilité de l'éveil ou encore lors de la consommation d'eau ou de nourriture (Buzsáki et al., 1983).

La génération des *sharp waves* serait due à l'activité en bouffées des cellules de CA3 de l'hippocampe sur les cellules de la couche stratum radiatum de la région CA1 ; tandis que les *ripples* semblent plutôt dues aux interactions excitatrices-inhibitrices locales dans CA1. En effet, les cellules pyramidales déchargent de manière à fournir un niveau d'excitation suffisant pour entraîner les interneurones qui, à leur tour, conduisent à une inhibition récurrente et synchrone des cellules pyramidales.

Les oscillations du sommeil paradoxal

Le **rythme thêta** est une des principales caractéristiques électrophysiologiques de l'hippocampe pendant le sommeil paradoxal. Deux types de thêta ont été identifiés. Le thêta de type I (5-8 Hz) est insensible à l'atropine et apparaît principalement pendant les comportements locomoteurs et le sommeil paradoxal. Le thêta de type II (4-7 Hz) est sensible à l'atropine et peut être observé pendant les comportements de peur ou sous anesthésie à l'uréthane, mais pas pendant le sommeil paradoxal. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons uniquement sur le thêta de type I, utilisé pour analyser le sommeil paradoxal.

Une des structures clés dans la genèse du rythme thêta est le septum médian. En effet, son inactivation abolit toutes formes de thêta et, à l'inverse, l'entraînement par optogénétique des neurones cholinergiques de cette structure accroît les oscillations thêta (Bland et Bland, 1986 ; Vandecasteele et al., 2014). Il contient également des neurones GABAergiques et glutamatergiques. Les neurones GABAergiques déchargent de manière rythmique à une fréquence thêta. Cette propriété intrinsèque de pacemaker est due à l'activation de canaux HCN, de l'anglais *Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*. Autrement dit, ces canaux s'ouvrent lors d'une hyperpolarisation de la membrane et laissent passer tous types de cations. Ainsi, les neurones GABAergiques du septum médian inhibent de manière rythmique les interneurones de l'hippocampe, ce qui conduit à une levée d'inhibition rythmique des cellules pyramidales. Les neurones cholinergiques, mentionnés au début de ce paragraphe, possèdent une fréquence de décharge plus lente et semblent plutôt impliqués dans la modulation de l'amplitude du thêta (Gerashchenko et al., 2001). Les

neurones glutamatergiques déchargent également de façon spontanée à une fréquence thêta et ont la capacité d'entraîner le rythme thêta par une excitation directe des cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe.

1.2 Les circuits neuronaux responsables des états de vigilance

Dans cette section, nous établirons un résumé de la littérature des structures clés contrôlant l'éveil (Figure 1.5), le sommeil lent (Figure 1.6) et le sommeil paradoxal (Figure 1.7). Chacune de ces structures contient une grande diversité de sous-populations neuronales qui s'entremêlent et participent à la régulation des états de vigilance. Du fait de cette importante hétérogénéité et de la complexité des réseaux, cette section ne se veut pas exhaustive, mais vise plutôt à donner un aperçu du cadre général. Pour chacune des populations neuronales citées, nous aborderons leurs principales caractéristiques moléculaires, leurs caractéristiques anatomiques (connectivité), leur activité neuronale basale au cours de chaque état de vigilance, ainsi que quelques études de perte et de gain de fonctions pour illustrer leur rôle.

1.2.1 Les circuits responsables de l'éveil

Dans le tronc cérébral

Les noyaux pédonculopontins et du tegmentum latérodorsal

Les noyaux pédonculopontin (PPT) et du tegmentum latérodorsal (LDT) se situent à la jonction du pont et du mésencéphale. Ils contiennent des neurones cholinergiques qui déchargent fortement pendant l'éveil ; en particulier pendant l'éveil actif, mais également pendant le sommeil paradoxal (Boucetta et al., 2014). La stimulation électrique des neurones du PPT induit une activité EEG rapide, typique de l'éveil, en partie via l'excitation des neurones thalamo-corticaux (Steriade et al., 1991). De même, l'activation chémogénétique de ces neurones abolit l'activité EEG basse fréquence du sommeil lent (Kroeger et al., 2017). Ainsi, les neurones cholinergiques du LDT/PPT peuvent supprimer l'activité corticale lente, mais il n'est pas clair qu'ils puissent directement favoriser l'éveil. En outre, le LDT/PPT contient également des populations plus clairsemées de neurones GABAergiques et glutamatergiques (Wang et Morales, 2009). Alors que l'activation chémogénétique spécifique des neurones glutamatergiques induit une augmentation de l'éveil pendant plusieurs heures, le rôle des neurones GABAergiques reste à préciser (Kroeger et al., 2017).

Le locus coeruleus

Le locus coeruleus (LC) contient environ la moitié des neurones noradrénergiques (NA) du cerveau et projette de manière diffuse vers l'ensemble du cerveau (Luppi et al., 1995). Les neurones du LC présentent une activité maximale pendant l'éveil, qui diminue fortement pendant le sommeil lent et devient silencieuse pendant le sommeil paradoxal (Chu et Bloom, 1974 ; Hobson et al., 1974 ; McCarley et Hobson, 1975 ; Aston-Jones et Bloom, 1981 ; Takahashi et al., 2010). Plus particulièrement, l'activité des neurones du LC est particulièrement élevée en cas de stress, de nouveaux stimuli ou de stimuli saillants indiquant une menace ou une récompense (Aston-Jones et Cohen, 2005). La photoactivation des neurones du LC réveille rapidement les souris (Carter et al., 2010). À l'inverse, leur photoinhibition favorise les transitions vers le sommeil lent et réduit légèrement l'éveil (Carter et al., 2010). Aussi, l'activation par optogénétique des neurones du LC induit des transitions vers l'éveil en quelques secondes, et ce, quel que soit l'état initial dans lequel l'animal se trouve au moment des stimulations (Carter et al., 2010). Ces données indiquent que les neurones NA du LC jouent un rôle clé dans la mise en place et le maintien de l'éveil.

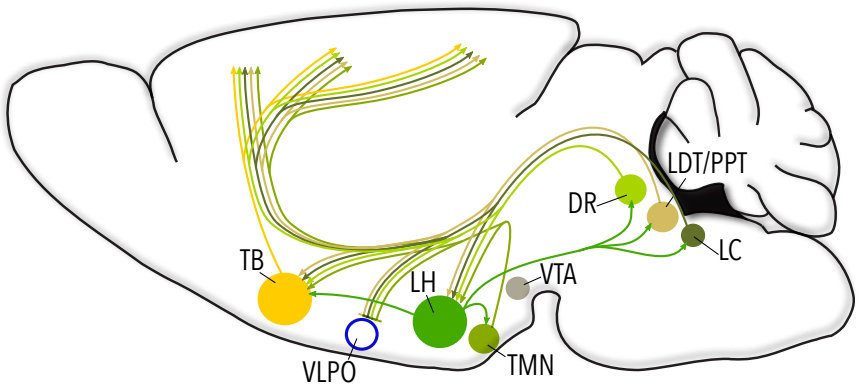


Figure 1.5. Représentation schématique des populations neuronales responsables de l'éveil
Pendant l'éveil, les populations cholinergiques et monoaminergiques du pont participent à l'excitation du thalamus et des neurones actifs pendant l'éveil de l'hypothalamus et du télencéphale basal. Les neurones orexine de l'hypothalamus latéral (LH) contribuent à renforcer l'activité des neurones monoaminergiques et cholinergiques du tronc cérébral et excitent également le cortex cérébral et le télencéphale basal, contribuant ainsi à l'activation corticale et à la stabilisation de l'éveil.

Le noyau du raphé dorsal

La majeure partie de la sérotonine du cerveau antérieur provient des noyaux du raphé dorsal (DR). Comme le LC, ces noyaux innervent et reçoivent des informations réciproques de nombreuses régions du cerveau qui régulent les états de sommeil et d'éveil. Initialement, une théorie sérotoninergique du sommeil (Jouvet, 1972) avait été proposée car des lésions du DR chez le chat induisent une insomnie. Depuis, cette théorie a été remise en cause par des données suggérant que l'augmentation du sommeil induite par l'inhibition de l'enzyme de biosynthèse de la sérotonine était confondue avec les effets d'une hypothermie induite par cette même inhibition (Murray et al., 2015).

La libération de sérotonine est plus importante pendant l'éveil que pendant les autres états de vigilance (Puizillout et al., 1979 ; Cespuglio et al., 1981 ; Portas et McCarley, 1994). De plus, la photo-activation des neurones sérotoninergiques double la quantité d'éveil et fragmente le sommeil lent (Ito et al., 2013), bien qu'une partie de cet effet puisse être attribuée à la colibération de glutamate (Liu et al., 2014). L'ensemble de ces données suggère que les neurones sérotoninergiques du DR seraient impliqués dans le contrôle de l'éveil (Fort et al., 2009 ; Saper et al., 2010). Toutefois, leur action sur les autres états de vigilance demeure mal comprise.

Dans l'hypothalamus

Les neurones à orexine de l'hypothalamus latéral

L'orexine (ou hypocrétine) est un neuropeptide essentiel à la régulation de l'éveil et du sommeil paradoxal (De Lecea et al., 1998 ; Sakurai et al., 1998). Les neurones à orexine (ORX) déchargent principalement pendant l'éveil, et particulièrement pendant l'éveil attentif ; à l'inverse, ils sont silencieux pendant le sommeil (Lee et al., 2005 ; Mileykovskiy et al., 2005). Ils produisent également du glutamate (et la dynorphine, un neuropeptide inhibiteur) dont la co-libération peut participer à exciter (ou inhiber) les neurones cibles (Schöne et al., 2014). La photo-activation des neurones ORX réveille les souris (Adamantidis et al., 2007). De même, l'activation chémogénétique de ces neurones augmente l'éveil et supprime fortement le sommeil paradoxal (Sasaki et al., 2011). Le rôle des neurones ORX dans le maintien de l'éveil est d'autant plus évident chez les souris présentant une dégénérescence spécifique de cette population neuronale. En effet, ces souris sont dépourvues de longues périodes d'éveil, sans toutefois impacter la quantité totale d'éveil qui n'est que

légèrement réduite (Branch et al., 2016). De plus, des transitions soudaines de l'éveil vers des états semblables au sommeil paradoxal sont observées (Chemelli et al., 1999). Des études suggèrent que le maintien de l'éveil par le système ORX passerait par le noyau tubéromamillaire (TMN) et le LC (Hasegawa et al., 2014 ; Mochizuki et al., 2011), ce qui suggère que la signalisation à travers ces régions est suffisante pour améliorer l'éveil. Cependant, les neurones ORX projettent largement dans le cerveau (Peyron et al., 1998) et des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer exactement quelles projections sont nécessaires à l'induction d'éveil et aux autres effets de l'ORX.

Le noyau tubéromamillaire

Le noyau tubéromamillaire (TMN) contient la quasi-totalité des neurones histaminergiques (HIST) du cerveau (Panula et al., 1984 ; Watanabe et al., 1984 ; Lin et al., 1994). Des enregistrements électrophysiologiques ont mis en évidence que les neurones HIST présentent un fort taux de décharge pendant l'éveil, qui diminue pendant l'éveil calme jusqu'à ce que ces neurones soient complètement silencieux pendant le sommeil (Steininger et al., 1999 ; Vanni-Mercier et al., 2003 ; Takahashi et al., 2006). Il a été montré, chez le rat, que les taux d'histamine intra-cérébrale sont plus élevés pendant la phase d'obscurité, pendant laquelle le rat est majoritairement actif (Mochizuki et al., 1992). Ces résultats renforcent donc le lien entre l'histamine et l'éveil. De plus, la libération d'histamine pendant l'éveil induit une activation tonique des neurones du thalamus et du cortex qui joue un rôle dans la désynchronisation corticale caractéristique de l'éveil (McCormick, 1992). De même, l'inhibition de la synthèse de l'histamine induit une augmentation des quantités de sommeil lent au détriment de l'éveil (Lin et al., 1988). En revanche, les neurones histaminergiques du TMN ne s'activent pas immédiatement lors de la mise en place de l'éveil, mais avec un délai (Takahashi et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les neurones HIST seraient plutôt impliqués dans les mécanismes permettant l'activation corticale et le maintien de l'éveil, mais ne seraient pas nécessaires à son déclenchement.

Dans le télencéphale basal

Le télencéphale basal regroupe plusieurs régions anatomiques : le septum médian, la substance innominée et les bandes verticale, diagonale et horizontale de Broca (Heimer et Alheid, 1991). Cette région comporte majoritairement des neurones cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques (Manns et al., 2001 ; Hur et Zaborszky, 2005). L'activité

des neurones cholinergiques du télencéphale basal est maximale pendant l'éveil et le sommeil paradoxal et minimale pendant le sommeil lent. De plus, ils déchargent en bouffées de potentiels d'action synchronisées avec le rythme thêta (Lee et al., 2005).

Les lésions ou l'inhibition spécifique des neurones cholinergiques augmentent les rythmes EEG lents et réduisent les transitions du sommeil lent vers l'éveil, sans affecter la quantité d'éveil (Chen et al., 2016 ; Fuller et al., 2011 ; Shi et al., 2015). À l'inverse, l'activation chémogénétique de ces neurones supprime l'activité EEG lente pendant le sommeil lent et le déstabilise pendant plusieurs heures, avec peu d'effet sur la durée d'éveil (Anaclet et al., 2015 ; Chen et al., 2016). Ces résultats montrent systématiquement que les neurones cholinergiques favorisent une activité corticale rapide, mais il est moins clair qu'ils soient nécessaires à déclencher l'éveil lui-même.

Contrairement aux neurones cholinergiques, les neurones GABAergiques du télencéphale basal sont clairement capables de favoriser l'éveil. En effet, l'activation chémogénétique des neurones GABAergiques augmente considérablement l'éveil et l'activité EEG rapide pendant plusieurs heures, tandis que leur inhibition augmente le sommeil lent pendant environ 3 heures (Anaclet et al., 2015). Cependant, les neurones GABAergiques du télencéphale basal sont anatomiquement et fonctionnellement hétérogènes : certains sont principalement actifs pendant l'éveil et le sommeil paradoxal, tandis que d'autres sont plus actifs pendant le sommeil lent (Hassani et al., 2009 ; Xu et al., 2015). Les futures expériences devront cibler spécifiquement certains sous-types afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs.

Quant aux neurones glutamatergiques du télencéphale basal, leur rôle est beaucoup moins connu. La photostimulation de ces neurones réveille systématiquement les souris à partir du sommeil lent et, bien que l'activation chémogénétique réduise légèrement les rythmes EEG lents, elle n'augmente pas l'éveil (Anaclet et al., 2015 ; Xu et al., 2015). Comme pour les neurones cholinergiques, les résultats divergent et nécessitent d'être précisés.

Le télencéphale basal semble donc constituer une structure importante pour l'activation corticale pendant l'éveil et le sommeil paradoxal. Cependant, sa contribution précise à la promotion et au maintien des différents états de vigilance reste à explorer.

Dans l'aire tegmentale ventrale

La capacité de la dopamine (DA) à stimuler l'éveil provient de l'observation que des médicaments qui augmentent ou diminuent la signalisation dopaminergique possèdent de puissants effets sur les états de vigilance. Par exemple, les médicaments qui augmentent les

concentrations synaptiques de DA favorisent fortement l'éveil, alors que les antagonistes de la DA, tels que les antipsychotiques, sont plutôt sédatifs (Wisor et al., 2001). Une des principales structures dopaminergiques du cerveau est l'aire tegmentale ventrale (VTA). De manière intéressante, son pattern d'activité n'est pas aussi typique que les autres structures monoaminergiques (LC, DR) mentionnées précédemment. Par exemple, il a été montré qu'une sous population de neurones de la VTA présente une activité en bouffées pendant le sommeil paradoxal (Dahan et al., 2007). Néanmoins, la modeste augmentation des niveaux de DA extracellulaire pendant les périodes d'éveil (Ferris et al., 2014) a rendu difficile l'association de cette structure à la régulation éveil-sommeil. L'inhibition chémogénétique des neurones DA de la VTA réduit l'éveil, en particulier, dans des conditions de forte motivation (recherche d'une nourriture ou d'un partenaire). À l'inverse, leur photostimulation réveille rapidement les souris (Eban-Rothschild et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les neurones DA de la VTA favorisent l'éveil, particulièrement dans des conditions de forte motivation.

En résumé :

- Les populations cholinergiques et monoaminergiques du pont participent à l'excitation du thalamus, des neurones de l'éveil dans l'hypothalamus, du télencéphale basal et du cortex.
- Les neurones ORX renforcent l'activité des populations cholinergiques et monoaminergiques et contribuent à l'activation corticale ainsi qu'à la stabilisation de l'état d'éveil.

1.2.2 Les circuits responsables du sommeil lent

La région préoptique

Suite à des études sur des patients atteints d'encéphalite léthargique, le neurologue Von Economo a rapporté que des lésions inflammatoires au niveau de la région préoptique (POA) étaient souvent associées à de profondes insomnies (Von Economo, 1926). Il a alors proposé que cette région serait essentielle à la génération du sommeil. Cette hypothèse a été renforcée par des études chez le singe et le rat dans lesquelles il a été montré que des lésions de la POA induisent une diminution du sommeil (Ranson, 1939 ; Sallanon et al., 1989).

Ces résultats ont été plus largement confirmés par des enregistrements unitaires effectués

dans la POA ayant montré que les neurones de cette région sont actifs pendant le sommeil (Kaitin, 1984 ; Szymusiak et McGinty, 1986 ; Ogawa et Kawamura, 1988 ; Koyama et Hayaishi, 1994 ; Szymusiak et al., 1998 ; Takahashi et al., 2009 ; Alam et al., 2014) ; et sont distribués au sein des parties médiale (MPOA) et latérale (LPOA) de la région préoptique, comme le montre des études par immunomarquage de la protéine c-Fos (Cirelli et al., 1995 ; Gong et al., 2000). En outre, la plupart des neurones de la POA présentent une augmentation progressive du taux de décharge juste avant le début du sommeil (Suntsova et al., 2002). Toutefois, il est important de noter que des neurones actifs pendant l'éveil ou le sommeil paradoxal ont également été identifiés au sein de la POA (Takahashi et al., 2009).

Il a été montré que l'activation chémogénétique des neurones de la MPOA et de la LPOA induit le sommeil lent (Zhang et al., 2015). Étonnamment, l'activation optogénétique des neurones GABA au sein de la MPOA et de la LPOA améliore l'éveil (Chung et al., 2017). Cependant, les mêmes auteurs ont également réalisé des activations plus ciblées des neurones GABA de la POA qui projettent au TMN et, dans ce cas, ils ont observé une augmentation du pourcentage de sommeil lent (et de sommeil paradoxal dans une moindre mesure) (Chung et al., 2017). En accord avec ces résultats, l'inhibition chémogénétique des neurones de la POA supprime le sommeil lent et le sommeil paradoxal (Chung et al., 2017). De plus, il a été montré que l'inhibition optogénétique des neurones exprimant la galanine (Gal, un peptide inhibiteur répandu dans la POA) dans la MPOA et la LPOA diminue le sommeil lent sans toutefois modifier les quantités de sommeil paradoxal (Kroeger et al., 2018). De manière intéressante, l'ablation des neurones galaninergiques dans la MPOA et la LPOA réduit la réponse à une privation de sommeil et atténue la puissance dans la bande delta pendant le sommeil lent (Ma et al., 2019). À l'inverse, l'activation optogénétique des neurones de la POA induit une augmentation de la puissance delta pendant le sommeil lent (Kroeger et al., 2018) qui est considérée comme un indicateur du besoin de sommeil (Franken et al., 2001). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les neurones galaninergiques de la POA jouent un rôle important dans la régulation homéostatique du sommeil.

En outre, les neurones de la POA sont réciproquement connectés à l'ensemble des systèmes impliqués dans l'éveil tels que le TMN, le DR, le LC, le LDT/PPT ou encore le prosencéphal basal (Luppi et al., 1995 ; Sherin et al., 1998 ; Gervasoni et al., 2000 ; Steininger et al., 2001 ; Lee et al., 2005 ; Uschakov et al., 2006 ; Suntsova et al., 2007 ; Fort et al., 2009), leur permettant ainsi d'inhiber l'ensemble de ces systèmes d'éveil afin d'induire et de maintenir le sommeil lent.

Des études par immunomarquage de la protéine c-Fos (un marqueur de l'activité neuronale) ont permis de délimiter plus précisément un cluster de neurones particulièrement actifs pendant le sommeil lent (Sherin et al., 1996) qui se situe dans la partie la plus ventrale de la région préoptique. Il s'agit du noyau préoptique ventrolatéral (VLPO). Il est brièvement mentionné ici, mais une partie entière lui sera consacrée dans le Chapitre 3.

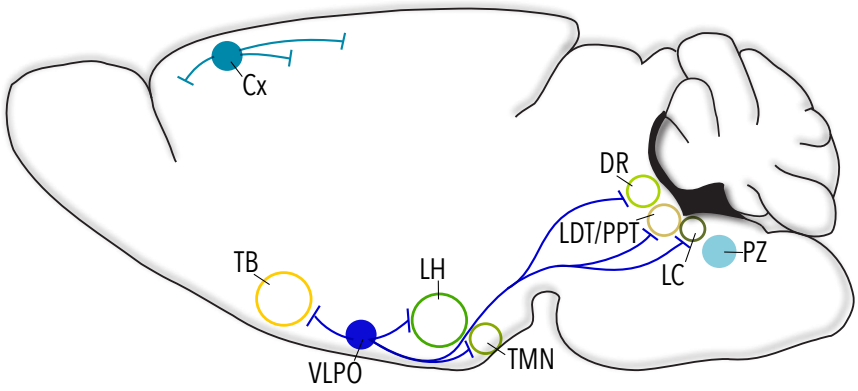


Figure 1.6. Représentation schématique des populations neuronales responsables du sommeil lent
Pendant le sommeil lent, les neurones du VLPO sont actifs et inhibent l'ensemble des systèmes monoaminergiques et cholinergiques associés à l'éveil (cercles vides). Quelques autres structures, en dehors de la région préoptique, commencent à être associées à la régulation du sommeil lent, telles que la zone parafaciale ou les interneurones corticaux nNOS qui montrent une activité importante pendant le sommeil lent.

La zone parafaciale

Bien que la plupart des études cherchant à caractériser les circuits impliqués dans la régulation du sommeil lent se soient focalisées sur la région préoptique, les premières études de transections suggèrent également l'existence d'un cluster de neurones favorisant le sommeil lent au niveau du tronc cérébral (Batini et al., 1958). En effet, un marquage c-Fos est retrouvé dans les neurones inhibiteurs de la zone parafaciale (PZ) après le sommeil lent, mais pas après l'éveil (Anaclet et al. 2012). De plus, des lésions de cette région ou l'inhibition spécifique de la transmission GABAergique/glycinergique induisent une augmentation de l'éveil (Anaclet et al. 2012, 2014). À l'inverse, l'activation chémogénétique de ces neurones induit de longues périodes de sommeil lent avec une forte puissance dans la bande delta,

similaire à celle observée après des privations de sommeil (Anaclet et al. 2014 ; Scammel et al., 2017). Ensemble, ces résultats suggèrent un rôle des neurones PZ dans l'induction et le maintien du sommeil lent. Cependant, des enregistrements électrophysiologiques des neurones PZ ont plus récemment montré qu'ils ne seraient pas actifs de manière sélective pendant le sommeil lent (Sakai, 2017).

Les neurones à oxyde nitrique synthase neuronale du cortex

Bien que la plupart des neurones corticaux soient actifs pendant l'éveil, une sous-population d'interneurones est particulièrement active pendant le sommeil lent (Scammel et al., 2017). Il s'agit des interneurones exprimant l'enzyme neuronale oxyde nitrique synthase (nNOS). Ils présentent un fort marquage c-Fos qui est proportionnel au temps passé en sommeil lent et à l'activité des ondes lentes (Gerashchenko et al., 2008 ; Morairty et al., 2013). L'inactivation du gène nNOS chez les souris transgéniques induit une diminution de la durée de sommeil lent ainsi qu'une diminution de la puissance dans la bande de fréquence delta (Morairty et al., 2013). Ces observations suggèrent un fort lien entre les interneurones corticaux nNos/ GABAergiques dans la régulation du sommeil lent et des manipulations spécifiques de ces neurones sont nécessaires afin de déterminer s'ils jouent un rôle causal dans la régulation du sommeil lent.

En résumé :

- Le VLPO joue un rôle central dans la mise en place du sommeil lent. Il est impliqué dans une boucle d'inhibition réciproque avec tous les principaux centres responsables de l'éveil.
- Quelques autres structures, en dehors de la région préoptique, commencent à être associées à la régulation du sommeil lent, telles que la zone parafaciale ou les interneurones corticaux nNOS. Il est nécessaire de confirmer l'implication de ces populations de neurones dans la régulation du sommeil lent, de préciser les relations de ces structures les unes par rapport aux autres et de déterminer leur rôle par rapport aux neurones de la région préoptique classiquement considérés comme promoteurs de sommeil lent.

1.2.3 Les circuits responsables du sommeil paradoxal

Concernant le sommeil paradoxal, les structures clés permettant sa mise en place et son maintien ont été principalement identifiées au niveau de deux régions majeures : le tronc cérébral et l'hypothalamus. Nous verrons également que d'autres structures, nouvellement associées au sommeil paradoxal, viennent remettre en question cette vision historique.

Dans le tronc cérébral

Le tronc cérébral a été la première structure associée à la régulation du sommeil paradoxal grâce aux études pionnières de transections réalisées par l'équipe de Michel Jouvet. Dans ces travaux, les auteurs ont mis en évidence chez des « chats pontiques » qu'un état similaire au sommeil paradoxal persistait, et ce, malgré l'absence de toutes les structures rostrales au pont (Jouvet, 1959 ; Jouvet, 1962). Ces résultats suggèrent que les structures du tronc cérébral sont nécessaires et suffisantes pour induire le sommeil paradoxal. Néanmoins, cette région contient divers types de neurones, notamment cholinergiques, noradrénergiques, glutamatergiques ou encore GABAergiques, et leurs fonctions respectives dans le contrôle du sommeil paradoxal sont encore débattues (Brown et al., 2012 ; Hobson et al., 1975 ; Clément et al., 2011 ; Lu et al., 2006).

Les noyaux pédonculopontins et du tegmentum latérodorsal

Suite aux célèbres travaux de transections de Jouvet, le pont a été longtemps considéré comme central dans la régulation du sommeil paradoxal. En effet, des travaux ont mis en évidence, par l'immunomarquage c-Fos, l'existence de neurones actifs après une hypersomnie de sommeil paradoxal dans le LDT et le noyau pédonculopontin (PPT) ; mais également que le nombre de neurones activés était corrélé aux quantités de sommeil paradoxal observées (Yamuy et al., 1993 ; Shiromani et al., 1996 ; Maloney et al., 1999, 2000). Les premières expériences pharmacologiques ont montré que l'injection d'un agoniste cholinergique induit une forte augmentation de sommeil paradoxal (George et al., 1964). Cependant, le rôle du LDT/PPT dans la génération du sommeil paradoxal a été débattu car l'injection d'antagonistes ou bien des lésions des neurones cholinergiques dans ces structures induisent des effets plus variables (Saper et al., 2010). En effet, les lésions électrolytiques du PPT, chez le chat, induisent une légère diminution du nombre de transitions vers le sommeil paradoxal et des lésions du LDT n'ont induit aucun effet (Shouse et Siegel, 1992 ; Webster et Jones, 1988). Chez le rat, des lésions plus restreintes du LDT ou du PPT ont induit des effets très modérés

sur le sommeil paradoxal et aucun changement sur l'activation corticale (Lu et al., 2006). Par la suite, des expériences ont montré que les neurones cholinergiques du LDT/PPT sont principalement actifs pendant le sommeil paradoxal mais également pendant l'éveil (Boucetta et al., 2014). En fait, ces neurones commencent à s'activer juste avant le début du sommeil paradoxal et l'éveil, ce qui suggère qu'ils pourraient contribuer à favoriser les transitions vers ces états. En lien avec ces résultats, des stimulations optogénétiques de ces neurones favorisent des transitions du sommeil lent vers le sommeil paradoxal, mais sans effet sur la durée du sommeil paradoxal (Van Dort et al., 2015), suggérant que les neurones du LDT/PPT pourraient contribuer à l'initiation, mais pas au maintien du sommeil paradoxal (Weber et Dan, 2016).

Finalement, le consensus s'est plutôt établi sur le fait que les neurones LDT/PPT seraient des modulateurs du sommeil paradoxal (Grace et Horner, 2015). En revanche, puisque ces neurones présentent une forte activité au moment des transitions vers le sommeil paradoxal, cela suggère que les structures contactées en aval pourraient jouer un rôle dans la mise en place de cet état (Héricé et al., 2018).

Le noyau sublatérodorsal

Une autre structure pontique recevant à la fois des projections des noyaux LDT/PPT et présentant une forte immunoréactivité c-Fos en réponse à une hypersomnie de sommeil paradoxal (Boissard et al., 2002 ; Lu et al., 2006) a été identifiée : il s'agit du noyau sublatérodorsal (SLD). Ce noyau contient des neurones spécifiquement actifs pendant le sommeil paradoxal qui présentent un pattern de décharge tonique tout au long de l'épisode (Sakai et Koyama, 1996 ; Sakai et al., 2001 ; Boissard et al., 2002). D'autre part, leur activation pharmacologique induit un état de sommeil paradoxal de longue durée qui se caractérise par une forte activité thêta sur l'EEG ainsi qu'une importante atonie musculaire (Boissard et al., 2002). En revanche, des lésions du SLD entraînent un état similaire au sommeil paradoxal, mais sans atonie musculaire (Krenzer et al., 2011). Bien que ces résultats questionnent l'implication du SLD dans la génération du sommeil paradoxal, ils corroborent son rôle dans la mise en place de l'anatomie musculaire. En effet, le SLD envoie des projections de nature glutamatergique (Luppi et al., 1988 ; Luppi et al., 2012 ; Luppi et al., 2024 ; Lu et al., 2006 ; Sapin et al., 2009 ; Clément et al., 2011) vers des structures inhibitrices dans le pont et la moelle épinière, notamment sur la medulla ventrale (vM) ou le noyau gigantocellulaire ventral (GiV). L'activation de ce dernier conduit à l'inhibition des

motoneurones, permettant ainsi la mise en place de l'atonie musculaire (Fort et al., 1989 ; Fort et al., 1993 ; Rampon et al., 1996 ; Boissard et al., 2002 ; Luppi et al., 2004 ; Lu et al., 2006 ; Sapin et al., 2009 ; Vetrivelan et al., 2009). Ces résultats révèlent donc un rôle primordial du SLD dans la mise en place de l'atonie musculaire et suggèrent qu'il interagit avec d'autres structures pour générer le sommeil paradoxal.

De manière intéressante, il a été montré que l'injection d'antagonistes GABA au niveau du SLD induit un état similaire au sommeil paradoxal (Boissard et al., 2002 ; Pollock et Mistlberger, 2003 ; Sanford et al., 2003), ce qui suggère que les neurones du SLD seraient sous l'influence d'un tonus inhibiteur important pendant le sommeil lent et l'éveil, notamment en provenance de la substance grise périaqueducale ventrolatérale (vlPAG) (Boissard et al., 2003 ; Varin, 2016).

La substance grise périaqueducale ventrolatérale

Les lésions, inactivations pharmacologiques ou encore inhibitions chémogénétiques de la substance grise périaqueducale ventrolatérale (vlPAG) induisent une augmentation du sommeil paradoxal (Sastre et al., 1996 ; Lu et al., 2006 ; Sapin et al., 2009 ; Hayashi et al., 2015 ; Weber et al., 2015). À l'inverse, l'activation par optogénétique des neurones de la vlPAG abolit le sommeil paradoxal (Weber et al., 2015 ; 2018 ; Hayashi et al., 2015). L'ensemble de ces résultats souligne l'implication de la vlPAG dans la régulation de cet état. En outre, il a été montré que la vlPAG contient une majorité de neurones GABAergiques silencieux pendant le sommeil paradoxal (dits « *SP-off* »), mais également une plus faible proportion de neurones exclusivement actifs pendant le sommeil paradoxal (dits « SP-on », Lu et al., 2006 ; Sapin et al., 2009 ; Weber et al., 2018). Ceci met en évidence la grande complexité de ces circuits. Néanmoins, sur la base de l'expression c-Fos, le pattern d'activité global semble montrer que la vlPAG est inactive pendant le sommeil paradoxal et active pendant les autres états (Sapin et al., 2009). En lien avec ces résultats, il a été suggéré que les neurones *SP-off* de la vlPAG projettent sur les neurones glutamatergiques du SLD (mentionnés précédemment), permettant ainsi d'éviter l'apparition de l'atonie musculaire pendant l'éveil et le sommeil lent (Lu et al., 2006). En outre, il a été suggéré que le SLD contient également des neurones GABAergiques actifs pendant le sommeil paradoxal qui innervent la vlPAG (Lu et al., 2006 ; Maloney et al., 2000). Ainsi, ces deux structures, vlPAG et SLD, formeraient un circuit d'inhibition mutuelle permettant la régulation du sommeil paradoxal (Lu et al., 2006) à l'instar du modèle flip-flop switch proposé par l'équipe de Saper

(Saper et al., 2010 ; il sera décrit dans le Chapitre 3). Toutefois, cette hypothèse n'est pas entièrement confirmée puisque les neurones GABA du SLD ne semblent pas spécifiquement actifs (par expression de c-Fos) après un rebond de sommeil paradoxal (Sapin et al., 2009).

D'autre part, il a été suggéré que la vlPAG reçoive des afférences en provenance de l'hypothalamus qui permettraient de réguler son activité. En effet, ce dernier pourrait inhiber directement (via ses projections GABA) ou indirectement (via ses projections des neurones à hormone de concentration de mélanine, MCH) les neurones PS-off de la vlPAG, permettant ainsi de lever l'inhibition qu'elle exerce sur le SLD pour faciliter la mise en place du sommeil paradoxal (Clément et al., 2012 ; Luppi et al., 2024).

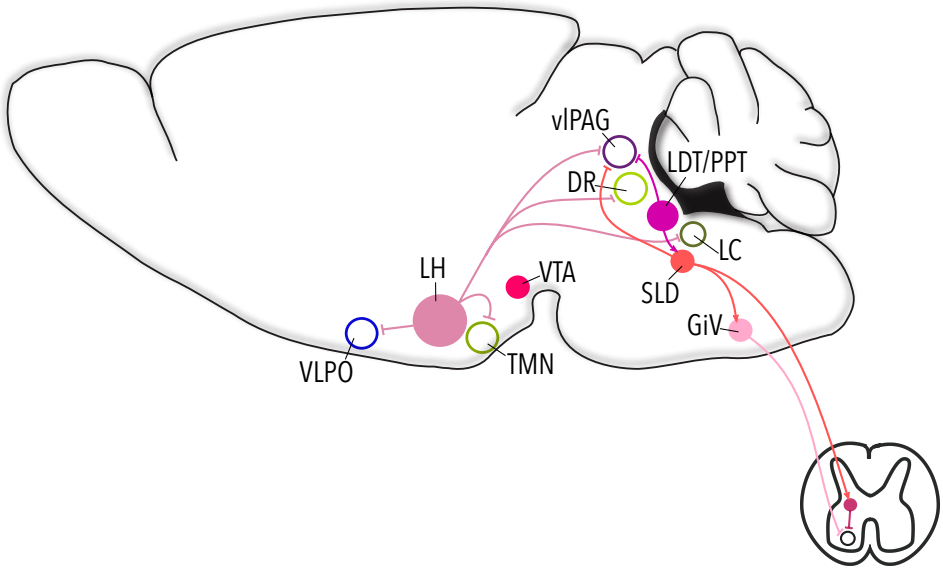


Figure 1.7. Représentation schématique des populations neuronales responsables du sommeil paradoxal

Pendant le sommeil paradoxal, les neurones du SLD sont actifs : une sous-population de neurones GABAergiques pourrait contribuer à l'hyperpolarisation de la vlPAG ; tandis que des neurones glutamatergiques génèreraient l'atonie musculaire par l'excitation d'interneurones spinaux ou de pré-motoneurones pontiques localisés dans le GiV. Les neurones cholinergiques du LDT/PPT (vert clair) pourraient contribuer au contrôle du SP en favorisant l'excitabilité du SLD et en facilitant l'inhibition de la vlPAG. De plus, les neurones MCH de l'hypothalamus latéral (vert) participent à la régulation du sommeil paradoxal en inhibant les structures monoaminergiques du pont.

En résumé au niveau du tronc cérébral :

- Les neurones glutamatergiques du SLD jouent un rôle crucial dans la régulation du sommeil paradoxal. Ils induisent l'atonie musculaire spécifique de cet état via l'excitation de neurones GABAegiques et glycinergiques dans la moelle ventromédiale et la moelle épinière qui hyperpolarisent les motoneurones.
- Les neurones cholinergiques des noyaux LDT/PPT modulent la régulation du sommeil paradoxal notamment via des projections sur le SLD.
- Pendant le sommeil lent et l'éveil, le SLD est inhibé par les neurones GABAergiques de la vlPAG et les neurones monoaminergiques du LC et du DR. À l'inverse, pendant le sommeil paradoxal, la vlPAG pourrait, à son tour, être inhibée par les neurones GABAergiques du SLD et/ou par les neurones GABA ou MCH de l'hypothalamus.

Dans l'hypothalamus

Les neurones à hormone de concentration de mélanine

Une importante activité c-Fos a été retrouvée au niveau de l'hypothalamus latéral dans les neurones à hormone de concentration de mélanine (MCH, Verret et al., 2003). Des études électrophysiologiques chez le rats ont également permis de confirmer que ces neurones étaient exclusivement actifs pendant le sommeil paradoxal et qu'ils projettent sur le SLD (Hassani et al., 2009). De plus, l'activation par optogénétique ou chémogénétique des neurones MCH induit une augmentation du sommeil paradoxal (Jego et al., 2013 ; Tsunematsu et al., 2014 ; Vetrivelan et al., 2016). En revanche, l'inhibition optogénétique de ces neurones ne produit que des effets mineurs sur le sommeil paradoxal et il en va de même chez les souris KO pour le récepteur MCH (Adamantidis et al., 2008 ; Jego et al., 2013 ; Tsunematsu et al., 2014 ; Varin et al., 2016). Ainsi l'ensemble de ces résultats semblent soutenir l'idée que les neurones MCH favorisent le sommeil paradoxal, mais ne seraient peut-être pas à l'origine du déclenchement de cet état (Scammel et al., 2017). En plus de leurs projections vers le SLD, les neurones MCH innervent différentes structures impliquées dans la suppression du sommeil paradoxal que nous avons mentionnées précédemment : le LC, le DR et la vlPAG (Scammel et al., 2017 ; Luppi et al., 2024). De plus, il a été montré que les neurones MCH co-libèrent du GABA et/ou du glutamate (Chee et al., 2015 ; Jego et al., 2013 ; Jennings et al., 2015). Ainsi, via la libération de ces neurotransmetteurs, les neurones

MCH pourraient respectivement inhiber les structures qui suppriment le sommeil paradoxal ou potentiellement activer les structures pontiques promotrices de sommeil paradoxal (Scammel et al., 2017).

En résumé au niveau de l'hypothalamus :

- Les neurones MCH, actifs pendant le sommeil paradoxal, semblent capables d'exercer un contrôle sur les structures du tronc cérébral connues pour supprimer le sommeil paradoxal (LC, DR et vlPAG). Grâce à leurs projections inhibitrices sur ces structures, les neurones MCH peuvent ainsi favoriser le sommeil paradoxal.

Les new challengers : la dopamine dans le circuit VTA-BLA

Une récente étude a mis en évidence une nouvelle population de neurones potentiellement impliquée dans le déclenchement du sommeil paradoxal au niveau du mésencéphale (Hasegawa et al., 2022). Il s'agit du circuit reliant les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) aux neurones de l'amygdale basolatérale (BLA, exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D2). Les auteurs ont montré que la stimulation optogénétique des terminaisons DA dans la BLA induit des transitions du sommeil lent vers le sommeil paradoxal, après une longue latence. Ils obtiennent des quantités de sommeil paradoxal passant de 10 % à plus de 30 % du temps total. De plus, ils montrent que l'inhibition optogénétique des terminaisons DA dans la BLA induit une suppression quasi totale du sommeil paradoxal. Ces résultats sont particulièrement surprenants puisque l'amygdale n'avait encore jamais été impliquée dans la régulation du sommeil paradoxal, mais plutôt dans la cataplexie survenant au cours de la narcolepsie (Fraigne et al., 2023 ; Luppi et al., 2024). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que les neurones dopaminergiques de la VTA inhibent les neurones de la BLA qui expriment le récepteur D2 afin d'induire le sommeil paradoxal. Néanmoins, le circuit en aval n'est pas encore connu (Fraigne et al., 2023). Une hypothèse suggère qu'il s'agit de l'activation de neurones GABAergiques de l'amygdale centrale qui entraînerait une cascade permettant l'inhibition de la vlPAG qui, à son tour, permettrait la désinhibition du SLD, un générateur du sommeil paradoxal décrit précédemment (Fraigne et al., 2023 ; Luppi et al., 2024).

1.3 Mécanismes à l'origine de l'alternance entre les états de sommeil

Dans la section précédente, nous avons exploré les différentes structures cérébrales et les circuits impliqués dans la mise en place et le maintien des différents états de vigilance. Toutefois, face à l'abondance de cette littérature et aux multiples hypothèses proposées, il peut s'avérer complexe d'appréhender la dynamique temporelle reliant ces structures et aboutissant à l'aspect cyclique entre sommeil paradoxal et sommeil lent. Pour appréhender cette complexité, nous avons choisi d'aborder les mécanismes sous l'angle de modèles proposés dans la littérature. Ces modèles, en association avec des données expérimentales, offrent une compréhension plus approfondie de la régulation du cycle ultradien. Nous allons donc examiner ici certains des modèles disponibles.

1.3.1 Modèles basés sur l'interaction entre deux populations antagonistes

Modèle d'interaction réciproque

Le modèle d'interaction réciproque se base sur l'interaction entre deux populations de neurones ayant un pattern de décharge antagoniste pendant le sommeil paradoxal (Figure 1.8C,D). Il est composé d'une population de neurones excitateurs active pendant le sommeil paradoxal (dite « *SP-on* ») et d'une population de neurones inhibiteurs silencieuse pendant le sommeil paradoxal (dite « *SP-off* »). Le premier modèle d'interaction réciproque proposé reproduisait l'activité des neurones cholinergiques du pont correspondant aux neurones *SP-on* en interaction avec les neurones du LC correspondant aux neurones *SP-off* (McCarley et Hobson, 1975). Le principe général du modèle est le suivant : pendant le sommeil lent, les neurones *SP-off* du LC inhibent les neurones cholinergiques *SP-on*. L'activité des neurones *SP-off* du LC décroit progressivement en raison d'une auto-inhibition, ce qui conduit à une levée d'inhibition progressive des neurones cholinergiques *SP-on,* entraînant une transition vers le sommeil paradoxal. À l'inverse, les neurones *SP-on* activent les neurones *SP-off,* ce qui entraîne la fin du sommeil paradoxal. Finalement, ce modèle mime bien l'évolution temporelle des patterns d'activité des deux populations *SP-on* et *SP-off* ainsi que la périodicité du sommeil paradoxal. Néanmoins, il s'est avéré trop sensible aux perturbations et n'inclut pas l'influence du rythme circadien (Héricé et al., 2019). Par la suite, ce modèle a été étendu en introduisant une variation circadienne (McCarley et Massaquoi, 1986).

Le modèle d'inhibition mutuelle

Le modèle d'inhibition mutuelle est inspiré du modèle *flip-flop switch* initialement proposé pour expliquer l'alternance veille-sommeil (Saper et al., 2010 ; il sera détaillé dans le Chapitre 3). Ce modèle a ensuite été étendu pour expliquer l'alternance entre sommeil lent et sommeil paradoxal (Figure 1.8E,F).

Le modèle d'inhibition mutuelle se base sur deux populations de nature GABAergique qui s'inhibent l'une l'autre (Lu et al., 2006 ; Saper et al., 2010 ; Diniz Behn et al., 2013 ; Booth et Diniz Behn, 2014). Il a été construit sur la base de données expérimentales suggérant que le SLD contient des neurones *SP-on* qui projettent sur la vlPAG. La vlPAG, quant à elle, contient des neurones *SP-off* qui projettent en retour sur le SLD (Lu et al., 2006). Toutefois, le rôle fonctionnel de ces projections n'a pas encore été directement testé (Weber, 2017). En outre, une autre structure candidate pouvant servir de substrat à ce modèle est la médulla ventrale (vM) qui contient des neurones *SP-on*. Elle forme un circuit d'inhibition réciproque avec le vlPAG et pourrait également participer à la mise en place de l'alternance sommeil lent/ sommeil paradoxal. En effet, son activation optogénétique déclenche des transitions du sommeil lent vers le sommeil paradoxal et prolonge la durée du sommeil paradoxal (Weber et al., 2015). De plus, le taux de décharge des neurones de la vM augmente juste avant une transition sommeil lent/sommeil paradoxal et diminue brutalement à la fin de l'épisode de sommeil paradoxal (Weber et al., 2015).

Cependant, l'inhibition mutuelle entre deux populations ne suffit pas à générer des transitions périodiques entre les deux états de sommeil (Diniz Behn et al., 2013). En effet, sans influence extérieure, le modèle converge vers un état stable (sommeil lent ou sommeil paradoxal). Pour pallier ce défaut, il a été proposé que la pression homéostatique du sommeil paradoxal qui s'accumule en l'absence de sommeil paradoxal (et s'affaiblit pendant le SP) pourrait forcer le réseau à effectuer une transition de manière périodique (Dunmyre et al., 2014). En effet, la pression de sommeil paradoxal exercerait un effet inhibiteur sur les neurones *SP-off,* réduisant ainsi leur excitabilité pendant le sommeil lent (Park et Weber, 2020). Ce mécanisme permettrait ainsi l'alternance entre sommeil lent et sommeil paradoxal. Des preuves expérimentales semblent en accord avec cette hypothèse puisque l'enregistrement des neurones GABAergiques de la vlPAG par optrodes ou par imagerie calcique révèle une diminution lente et progressive de leur activité au cours des intervalles inter-sommeil paradoxal (Weber et al., 2018).

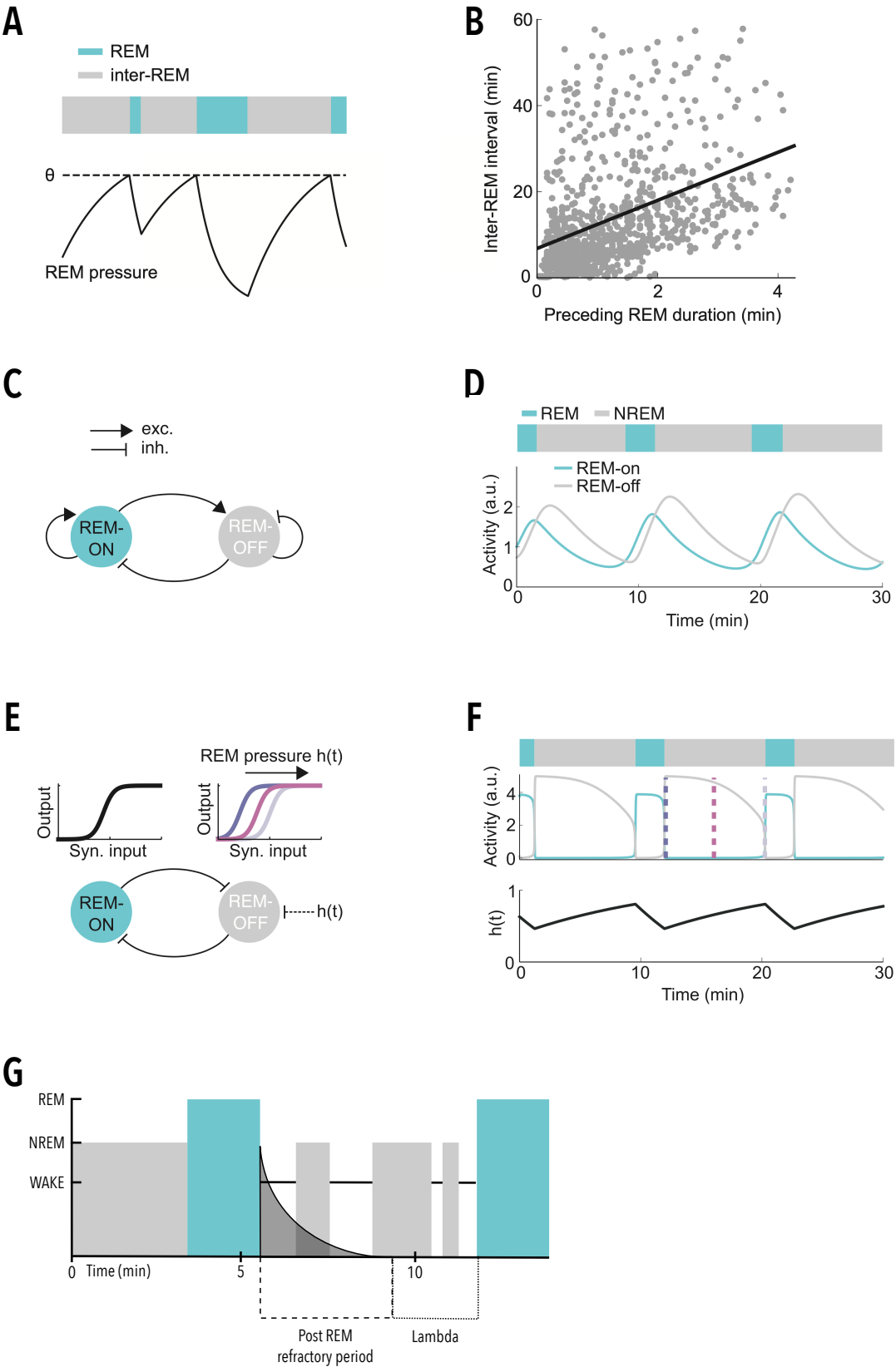

A
REM
inter-REM
θ
REM pressure
B
Inter-REM interval (min)
Preceding REM duration (min)
C
exc.
inh.
REM-ON
REM-OFF
D
REM
NREM
REM-on
REM-off
Activity (a.u.)
Time (min)
E
REM pressure h(t)
Output
Syn. input
REM-ON
REM-OFF
h(t)
F
Activity (a.u.)
h(t)
Time (min)
G
REM
NREM
WAKE
Time (min)
Post REM refractory period
Lambda

Figure 1.8. Les modèles de régulation du sommeil paradoxal
A-B. Modèle de régulation homéostatique du sommeil paradoxal. Schéma illustrant le modèle de régulation homéostatique du timing du sommeil paradoxal. La pression homéostatique du sommeil paradoxal s'accumule en l'absence de cet état, autrement dit, pendant les intervalles inter-épisodes, et se décharge pendant les épisodes eux-mêmes. Le sommeil paradoxal se déclenche une fois que la pression de sommeil paradoxal atteint le seuil θ (ligne pointillée). Ainsi, des périodes de sommeil paradoxal plus longues précèdent des intervalles inter-épisodes plus longs (**A**). Corrélation entre l'intervalle inter-épisode de sommeil paradoxal et la durée de l'épisode précédent. Chaque point représente un seul épisode. Les épisodes de sommeil paradoxal et les intervalles inter-épisodes sont positivement corrélés (**B**). Le modèle en A. peut expliquer cette corrélation positive. **C-D.** Modèle d'interaction réciproque. Schéma du modèle d'interaction réciproque (**C**). Chaque nœud représente le couplage synaptique entre les populations neuronales : les cercles indiquent une inhibition et les flèches indiquent une excitation. Simulation du modèle d'interaction réciproque illustrant l'activité des populations *SP-on* et *SP-off* ainsi que l'hypnogramme résultant (**D**). **E-F.** Modèle d'inhibition mutuelle. Schéma du modèle d'inhibition mutuelle (**E**). Les populations inhibitrices de neurones *SP-on* et *SP-off* s'inhibent mutuellement (en bas). Les nœuds représentent les taux de déclenchement moyen des populations *SP-on* et *SP-off*. Les fonctions d'entrée-sortie sigmoïde décrivent la cadence de déclenchement en fonction de l'entrée synaptique inhibitrice (en haut). L'accumulation de pression homéostatique du sommeil paradoxal, notée h(t), induit un déplacement vers la droite de la fonction d'entrée/sortie *SP-off* tout au long du sommeil NREM, entraînant une excitabilité réduite des neurones *SP-off*. Simulation du modèle d'inhibition mutuelle (**D**). L'activité moyenne des populations *SP-on* et *SP-off* (au milieu) est représentée avec l'hypnogramme (en haut) et la pression homéostatique du sommeil paradoxal h(t) (en bas). A-F : *Adapté de Park et Weber, 2020*. **G.** Représentation schématique de l'hypothèse asymétrique pour l'alternance sommeil lent-sommeil paradoxal. Les épisodes de sommeil paradoxal limitent leur propre durée. La période réfractaire post sommeil paradoxal (*post-REM refractory period*, PRRP) empêche alors la pression du sommeil paradoxal d'initier un nouvel épisode trop rapidement après celui qui vient de se terminer. La durée Lambda est relativement courte dans l'exemple. *Adapté de Le Bon, 2021*.

1.3.2 Modèles basés sur l'auto-régulation du sommeil paradoxal

Modèle de l'homéostasie à court terme du sommeil paradoxal

L'hypothèse de l'homéostasie à court terme est proposée pour la première fois par l'équipe de Vivaldi (Vivaldi et al., 1994) et a été reformulée par Franken (2002). Elle se base sur la corrélation positive entre la durée d'un épisode de sommeil paradoxal et l'intervalle inter-sommeil paradoxal immédiatement consécutif (Figure 1.8A,B). Cet intervalle comprend tous les épisodes de sommeil lent et d'éveil qui surviennent entre la fin de l'épisode de sommeil paradoxal considéré et le début du suivant. La pression homéostatique du sommeil paradoxal s'accumule en l'absence de sommeil paradoxal, autrement dit, pendant ces intervalles et diminue pendant le sommeil paradoxal. Lorsque la pression de sommeil paradoxal est

suffisamment forte, le sommeil paradoxal se déclenche. Ainsi, des épisodes de sommeil paradoxal plus longs précèdent des intervalles plus longs. En d'autres termes, la durée d'un épisode de sommeil paradoxal détermine l'apparition du prochain épisode. Par la suite, un processus à plus long terme a été ajouté (Franken, 2002) selon lequel la pression homéostatique s'accumule sur une période plus importante (de l'ordre de plusieurs heures) pendant le sommeil lent et l'éveil, ce qui permettrait de réguler la quantité quotidienne de sommeil paradoxal.

L'hypothèse asymétrique

Selon l'hypothèse asymétrique (Le Bon, 2021) (Figure 1.8G), le sommeil paradoxal apparaît de manière relativement opportuniste quand les conditions idéales (détaillées ci-après) le permettent. La mise en place d'un épisode de sommeil paradoxal requiert (1) une période minimale de sommeil lent le précédent. Si (2) la pression de sommeil paradoxal est suffisamment importante, le sommeil paradoxal peut alors interrompre le sommeil lent (probablement via les structures *SP-on* inhibant les *SP-off*). Deux possibilités sont alors envisageables : la pression de sommeil lent est élevée (comme c'est le cas au début des nuits chez l'homme), dans ce cas le sommeil paradoxal n'atteindra pas sa durée maximale et sera interrompu à son tour par le sommeil lent. À l'inverse, si la pression de sommeil lent est faible (comme c'est le cas en fin de nuit chez l'homme), l'épisode de sommeil paradoxal peut prendre place et atteindre sa durée maximale. Dans le cadre de cette hypothèse, la durée d'un épisode de sommeil paradoxal détermine uniquement la durée d'une (3) période réfractaire post-sommeil paradoxal (et non le moment du prochain épisode de sommeil paradoxal) qui se mettrait en place suite à l'activation des structures *SP-off*. Cette inhibition va progressivement décroître avec le temps, laissant place à une période plus propice à l'apparition d'un prochain épisode de sommeil paradoxal. Dans cette hypothèse, la période réfractaire est suivie d'une période appelée Lambda, d'une durée indéterminée, qui est constituée d'épisodes isolés de sommeil lent et d'éveil. La période réfractaire associée à la période Lambda forment ensemble l'intervalle inter-sommeil paradoxal. Grâce à cette conceptualisation, l'intervalle inter-sommeil paradoxal peut être de durée variable, comme généralement observé dans le cadre expérimental. Par la suite, la pression de sommeil paradoxal « détournera » un épisode de sommeil lent compatible avec les trois critères mentionnés précédemment afin de créer dès que possible un nouvel épisode de sommeil paradoxal, et ainsi de suite.

En résumé :

- Tous les modèles ne sont pas incompatibles. Par exemple, l'intervention de la pression de sommeil paradoxal est commune au modèle d'inhibition mutuelle qui rejoint donc le modèle d'homéostasie à court terme.
- Par contre, la nature de la pression de sommeil paradoxal intervenant dans plusieurs modèles reste encore indéterminée. De plus, il n'est pas clair si celle-ci peut moduler l'excitabilité des neurones sur une échelle de temps qui correspond au cycle de sommeil.
- Le modèle d'inhibition mutuelle suggère que les transitions entre les états de sommeil sont directes et rapides sans état transitoire/intermédiaire, ce qui n'est pas systématiquement le cas lors d'un sommeil physiologique.
- Les neurones GABAergiques de la vlPAG joueraient un rôle central et semblent être le meilleur candidat comme substrat neuronal permettant d'expliquer l'alternance entre les deux états de sommeil. En effet, leur activité diminue progressivement entre les épisodes de sommeil paradoxal et augmente au début de chaque épisode, ce qui mime bien l'accumulation et la dissipation de la pression du sommeil paradoxal.
- L'hypothèse asymétrique offre une alternative qui ne requiert pas l'intervention d'un « oscillateur » à l'origine de l'accumulation et dissipation successives de la pression de sommeil paradoxal dont la nature est inconnue. Elle permet également une certaine variabilité dans la durée des intervalles inter-sommeil paradoxal qui reflète mieux le sommeil des espèces polyphasiques comme les rongeurs.

En conclusion, le sommeil joue un rôle essentiel pour la survie d'un individu. Bien que sa fonction précise pour le bon fonctionnement de l'organisme demeure un mystère, une attention considérable a été portée à l'identification des différentes structures cérébrales responsables de sa mise en place. En effet, l'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence de vastes réseaux qui s'entremêlent à travers tout le cerveau pour générer chacun des états de vigilance. Néanmoins, il est moins clair de comprendre par quels mécanismes chaque état, et notamment les deux sous-stades de sommeil, interviennent au cours de la nuit de manière successive et ordonnée. Une piste pour tenter de comprendre cette régulation serait d'identifier quels facteurs peuvent induire/provoquer des transitions d'un état de

sommeil à l'autre, ou bien d'un état de sommeil à l'éveil ; mais également, de déterminer quelles peuvent être les structures en amont capables de moduler l'activité de ces centres de sommeil permettant ainsi de faire basculer les circuits dans un autre état.

Chapitre 2 : Le stress

Dans le chapitre précédent, j'ai présenté à quel point le sommeil est un phénomène complexe, de par la multitude de structures cérébrales qui interviennent, leurs interactions qui s'établissent à travers tout le cerveau et les facteurs internes ou externes qui peuvent influencer la régulation de chacun des états.

Parmi les facteurs externes pouvant influencer le sommeil, il en existe un que je n'ai pas encore mentionné, mais qui est au cœur de mes travaux de thèse et qui peut avoir des effets délétères : le stress. En effet, chacun d'entre nous a déjà expérimenté une mauvaise nuit de sommeil la veille d'un examen ou d'une présentation importante, par exemple. Dans ce chapitre, je définirai le stress avant de présenter les différents effets qu'il peut engendrer sur le sommeil. Je tenterai de rendre compte de la complexité de ces effets en abordant différents aspects/paramètres du facteur stressant et les conséquences parfois opposées qu'ils peuvent induire sur le sommeil. Pour finir, je présenterai le stress par défaite sociale, que j'ai utilisé dans mes travaux de thèse, et comment ce dernier s'intègre dans cette littérature abondante et dans laquelle on trouve peu de consensus.

2.1 Mécanismes de la réponse au stress

2.1.1 Historique et définition du stress

Le physiologiste français Claude Bernard a largement participé à l'émergence du concept moderne de stress, notamment avec sa théorie du « milieu intérieur », selon laquelle le corps travaille constamment afin de maintenir un environnement interne stable et équilibré (Bernard, 1865). Par exemple, il observe que lorsque le corps a froid, les vaisseaux sanguins se rétrécissent afin d'empêcher la chaleur corporelle de s'échapper, et c'est l'inverse qui se produit lorsque le corps a chaud.

En s'appuyant sur les précédents travaux de Bernard, Walter Cannon émet le concept d'homéostasie pour décrire le maintien de plusieurs variables physiologiques, telles que la glycémie ou la température, dans un état stable ne dépassant pas un intervalle de limites acceptables. Il suggère que l'homéostasie soit maintenue de deux façons : soit par les organes des sens, soit par la rétroaction négative du système nerveux autonome (Cannon, 1929). Il propose que la libération d'adrénaline dans la circulation sanguine joue un rôle clé dans la mise en place des fonctions adaptatives permettant à l'organisme de répondre à un stress

aigu, notamment en le préparant à fuir ou combattre lorsqu'il est face à un prédateur, par exemple (« fight or flight », Cannon, 1929).

Enfin, Hans Seyle travaille sur ce qu'il appelle le syndrome général d'adaptation qui se décompose en trois phases (Selye, 1974). La première phase d'alarme correspond à la phase de stress aigu où le corps se prépare à répondre au facteur de stress. Puis, vient la seconde phase de résistance durant laquelle le corps se prépare à une attaque soutenue à l'encontre du facteur stressant. Durant cette phase, la réponse immunitaire s'intensifie et l'organisme s'adapte au stress spécifique. Enfin, la troisième phase correspond à la phase d'épuisement. La résistance au stress ne peut plus être soutenue par l'organisme, les systèmes de régulation sont dépassés, ce qui entraîne un impact négatif sur la santé générale et peut conduire à la pathologie. Dans une série d'expériences, Seyle a injecté différentes substances (par exemple, le formaldéhyde, la morphine ou l'adrénaline) chez des rats et a constaté, dans tous les cas, que les animaux présentaient des symptômes similaires ; à savoir, une hypertrophie des glandes surrénales, une atrophie du tissu lymphoïde ou encore des ulcères à l'estomac. Par ailleurs, il a constaté que ces effets étaient également induits par d'autres types de situations défavorables telles qu'un froid extrême, un effort physique excessif ou encore une intervention chirurgicale. Seyle en conclut que ces modifications physiologiques correspondent à des réponses adaptatives non spécifiques à différents types de stress (Selye, 1936, 1950). Il a également identifié différentes hormones impliquées dans la réponse au stress. Notamment, il montre que l'injection d'un extrait surrénalien reproduit les effets du syndrome général d'adaptation. Depuis, la substance responsable de ces effets a été purifiée : il s'agit du cortisol.

Finalement, le stress est une réponse physiologique de l'organisme aux changements de l'environnement qui a pour résultat de maintenir son état d'équilibre. Cette réponse est largement conservée au cours de l'évolution chez les espèces vertébrées et consiste à la fois en une réponse neuro-endocrinienne et une réponse sympathique qui sont mises en jeu à travers deux axes : l'axe sympatho-surrénalien (SAM) et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) (Figure 2.1). Le premier, l'axe SAM, peut activer la réponse de combat ou de fuite via le système nerveux sympathique pour une adaptation aiguë et rapide au stress ; tandis que le système nerveux parasympathique ramène le corps à l'homéostasie. Le second grand centre physiologique de la réponse au stress, l'axe HPA, régule la libération de cortisol qui influence de nombreuses fonctions corporelles telles que les fonctions métaboliques, psychologiques et immunologiques.

2.1.2 Activation de l’axe sympatho-surrénalien et de l’axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Activation de l’axe sympatho-surrénalien

L’activation de l’axe sympatho-surrénalien (SAM) est considérée comme le médiateur des effets à court terme de la réponse au stress grâce à la mise en place de réponses rapides (Joëls et Baram, 2009 ; Tank et Lee Wong, 2015). Le système noradrénergique central, en particulier le LC, est impliqué dans les réponses au stress aigu (Myers et al., 2017), agissant comme un système d'alarme, dans les réponses d'attention, d'excitation et de défense (Cassens et al., 1981 ; Valentino et Van Bockstaele, 2008). Grâce à ses projections directes vers les neurones du système sympathique (Ulrich-Lai et Herman, 2009), il permet la libération d’adrénaline et de de noradrénaline par la médullosurrénale (Cannon, 1914 ; de Kloet et al., 2005 ; Joëls et Baram, 2009 ; Kvetnansky et al., 2009). L’augmentation d’adrénaline et noradrénaline dans la circulation induit des changements physiologiques qui permettent de préparer le corps à la réaction de combat ou de fuite (Cannon, 1915, 1929), avec notamment le maintien de la vigilance, les actions métaboliques (augmentation du glucose, la lipolyse, l'augmentation de la consommation d'oxygène et de la thermogenèse) et les actions cardiovasculaires.

Activation de l’axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Le stress entraîne également une cascade hormonale au niveau de l’axe HPA (Smith et Vale, 2006). Le premier acteur dans cette cascade est le noyau paraventriculaire de l’hypothalamus (PVN) qui libère la corticolibérine (CRH, *corticotropin-releasing hormone* en anglais). Le lobe antérieur de l’hypophyse est stimulé par le CRH et va libérer, à son tour, l'hormone corticotrophique surrénalienne (ACTH). Cette dernière va alors provoquer la libération de cortisol (ou corticostérone chez les rongeurs) par le cortex surrénalien. Le cortisol a des effets sur de nombreux tissus au niveau central et périphérique. Il va notamment permettre d'augmenter la glycémie par gluconéogenèse, de supprimer le système immunitaire et de faciliter le métabolisme des graisses, des protéines et des glucides (Marieb et Hoehn, 2007). Le cortisol est également impliqué dans une boucle de rétroaction négative pour réguler à la baisse la production de cortisol via des récepteurs aux glucocoticoïdes au niveau de l’hypothalamus et de l’hypophyse. L'activation de l'ensemble de ce système se produit en quelques minutes. La réponse maximale du cortisol se produit 20 à 40 minutes après le début

du stress et le retour aux niveaux de base, se produit en moyenne 40 à 60 minutes après la fin du stress (Dickerson et Kemeny, 2004).

Les axes SAM et HPA sont régulés par plusieurs régions du cerveau, notamment le système limbique, le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hypothalamus et la strie terminale (Ulrich-Lai et Herman, 2009). Grâce à ces mécanismes, le stress peut altérer les fonctions de mémoire, la récompense, la fonction immunitaire, le métabolisme et la susceptibilité aux maladies (Stephens et Wand, 2012).

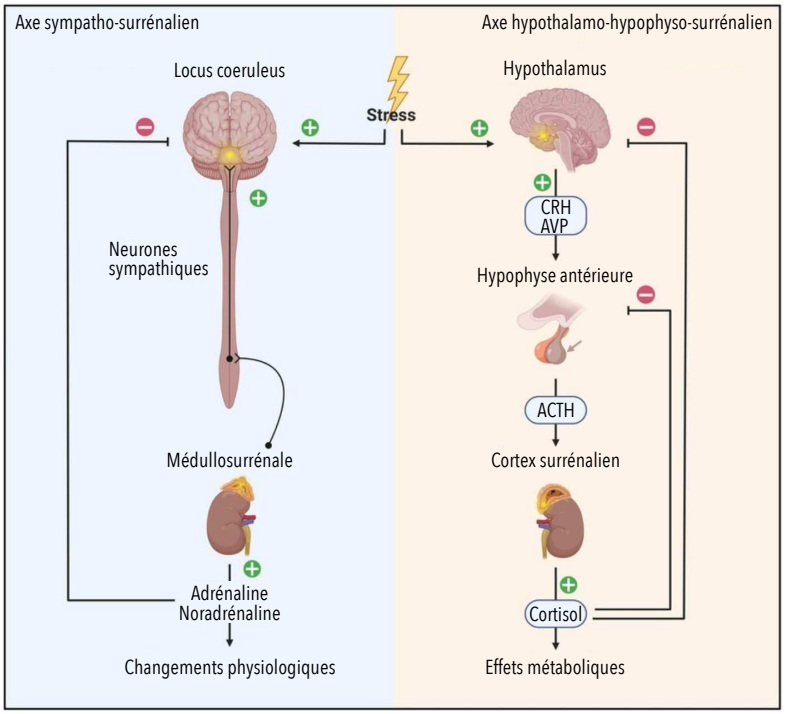


Figure 2.1. Schéma illustrant l'activation des axes sympatho-surrénalien et hypothalamo-hypophyso-surrénalien en réponse au stress
En réponse au stress, une première cascade se met rapidement en place : le LC, via ses projections sur les neurones du système sympathique, entraine la libération de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par la médullosurrénale. La libération de catécholamines induit des changements physiologiques rapides pour produire une réponse au stress adaptée et est également à l'origine d'une boucle de rétroaction négative pour diminuer la réponse au stress (à gauche). En parallèle, avec une cinétique un peu plus lente, l'hypothalamus libère le CRH qui permet d'activer l'hypophyse qui sécrète à son tour l'ACTH. L'ACTH stimule le cortex surrénalien qui libère du cortisol (ou corticostérone chez les rongeurs). Le cortisol va, à la fois, induire des changements métaboliques et jouer un rôle de rétroaction sur cette cascade afin de diminuer la production de cortisol (à droite). *Adapté de Carlton et al., 2021.*

2.1.3 Production d’une réponse adaptée

Les stratégies d'adaptation (ou coping) sont essentielles pour minimiser l'impact du stress et permettent notamment de déterminer le degré de résilience ou de susceptibilité d’un individu. Le style d'adaptation, actif ou passif, varie selon les individus et il influence également la manière dont les systèmes neuro-endocriniens et neuro-immunologiques sont activés en réponse au stress (Zozulya et al., 2008). Par exemple, le style d’adaptation passif a été associé à une augmentation des taux plasmatiques de corticostérone suite à une défaite sociale chronique (Gomez-Lazaro et al., 2011) ; et est également souvent une caractéristique des patients atteints de troubles de stress post-traumatique (Taylor et Stanton, 2007).
Chez les rongeurs, on retrouve également les stratégies d’adaptation active/passive : l’adaptation active se manifeste par des comportements défensifs/agressifs, des activités de combat et d’exploration ; tandis que l’adaptation passive se manifeste par des comportements de soumission, d’immobilité ou de *freezing* (Franklin et al., 2012). Le *freezing* est un comportement stéréotypé de défense en réponse à un événement stressant. Il se caractérise par une diminution des mouvements corporels, une diminution de la fréquence cardiaque et une augmentation du tonus musculaire (Hagenaars et al., 2014). Ces comportements peuvent être mesurés de manière fiable et permettent d’évaluer les réponses au stress.

En résumé :

- Le stress peut se définir comme une réponse physiologique, induite par des changements de l'environnement perçus comme stressants, ayant pour but de maintenir l’état d’équilibre de l’organisme.
- La réponse au stress met en jeu l’axe SAM dont l’activation est rapide et permet la libération de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui vont permettre de préparer l’organisme à combattre ou à fuir, par exemple.
- La réponse au stress met également en jeu, avec une cinétique plus lente, l’axe HPA. Il permet *in fine* la libération de cortisol qui, d’une part, influence de nombreuses fonctions (métaboliques, psychologiques et immunologiques) et, d'autre part, régule à la baisse la libération de cortisol par une boucle de rétroaction négative.
- La mise en place de l’ensemble de ces processus physiologiques permet de développer des stratégies d’adaptation, essentielles à la survie d’un individu. Chez le rongeur, on

distingue des stratégies actives (combat par exemple) des stratégies passives (fuite, *freezing* par exemple).

2.2 Effets du stress sur le sommeil

Le stress est généralement considéré comme une réponse du corps et du cerveau pour faire face aux défis auxquels un individu peut être confronté. Cette réponse nécessite un certain état d'alerte ; autrement dit, le stress induit systématiquement au moins une courte période d'éveil (Sanford et al., 2015). Cohérent avec ces résultats, la réponse au stress met en jeu des neuropeptides et hormones classiquement impliqués dans la régulation de l'éveil et, par conséquent, inhibe le sommeil (Sanford et al., 2015).
Suite à cette phase initiale d'éveil induite par le stress, l'architecture du sommeil suivant est généralement également perturbée. Cependant, l'impact du stress sur le sommeil peut varier en fonction des caractéristiques spécifiques du facteur de stress considéré (durée, intensité, contrôlabilité et prévisibilité), mais aussi des caractéristiques liées à l'individu (stratégies d'adaptation au stress, résilience et vulnérabilité).

2.2.1 Effets d'un stress aigu versus chronique

Un des premiers paramètres permettant de dissocier les effets du stress sur le sommeil est la durée d'exposition au stress. En effet, un stress aigu, c'est-à-dire un événement isolé dans le temps, va pousser l'organisme à chercher un nouvel état d'équilibre. Rapidement, différents mécanismes, tels que les boucles de rétroaction générées par les catécholamines et le cortisol, sont mis en place afin de réduire voire « d'éteindre » la réponse au stress. Il va également y avoir la mise en mémoire des nouvelles informations associées au facteur de stress afin d'optimiser la réponse lors d'une future exposition à une situation similaire. En revanche, lors d'un stress chronique, qui perdure dans le temps, l'organisme ne va plus parvenir à retrouver l'équilibre, il est dépassé. C'est ce qui peut conduire à un état pathologique qui se caractérise par différents symptômes d'ordre biologique et psychologique.

Le stress aigu

L'exposition à des chocs électriques est une méthode classiquement utilisée pour induire un stress chez les rongeurs (Pawlyk et al., 2008). Cette procédure est généralement associée à une diminution de la quantité de sommeil paradoxal (Kant et al., 1995 ; Palma et al., 2000 ;

Vázquez-Palacios et Velázquez-Moctezuma, 2000). D'autres études ont rapporté des résultats similaires suite à l'exposition à des chocs inévitables (Adrien et al. 1991 ; Sanford et al. 2003) ainsi qu'après un stress social (conflit) (Meerlo et Turek, 2001).

Il est intéressant de noter que le sommeil paradoxal perdu suite à un stress aigu est généralement compensé ultérieurement par un rebond de sommeil paradoxal dans la phase de récupération (Rampin et al. 1991 ; Meerlo et Turek, 2001). Toutefois, ce n'est pas le cas de toutes les procédures de stress puisque ce rebond n'est par exemple pas observé suite aux chocs inévitables délivrés pendant le paradigme de peur conditionnée (Sanford et al., 2003, 2010). Il n'est pas clair pourquoi certains facteurs de stress induisent une compensation ultérieure et d'autres pas. Par exemple, il a été suggéré que le stress social aigu constitue une forme d'éveil intense qui nécessite un besoin de sommeil plus accru pour récupérer (Meerlo et al. 1997 ; Pawlyk et al., 2008). Il pourrait alors s'agir d'une réponse adaptative, comme certaines études utilisant le stress par contention ont pu le suggérer (Suchecki et al. 2012).

La variabilité des résultats obtenus sur le sommeil pourrait s'expliquer par la nature du facteur de stress et les effets qu'il peut avoir sur la physiologie d'un individu. Cette variabilité pourrait également s'expliquer par la façon dont est perçu le stress par l'individu, notamment en termes de contrôlabilité et de prévisibilité (détaillés ci-dessous), mais également si une stratégie d'adaptation est mise en place ou non (Sanford et al., 2015).

Le stress chronique

Le stress chronique consiste généralement en la répétition d'un stimulus stressant, ou de plusieurs stimuli différents, présentés les uns après les autres sur une période prolongée. Un protocole classiquement utilisé pour réaliser un stress chronique est le modèle de « stress chronique léger » qui consiste en la présentation de différents stimuli une à deux fois par jour pendant plusieurs semaines (Cheeta et al., 1997). Les stimuli utilisés comprennent l'inclinaison de la cage, l'exposition à une cage mouillée ou sale, la privation de nourriture ou d'eau ou encore l'exposition à la lumière en continue. Ces études ont notamment mis en évidence une augmentation du sommeil paradoxal qui s'est traduite par une augmentation de la durée des épisodes et des transitions vers cet état, ainsi qu'une latence réduite pour l'apparition du premier épisode de sommeil paradoxal (Cheeta et al., 1997).

D'autres études ont utilisé l'exposition à des chocs électriques durant une période prolongée : les animaux ont été placés dans des chambres opérantes pendant deux semaines. Les deux groupes ont montré une diminution du temps de sommeil total et, en particulier, du sommeil

paradoxal dès le premier jour de stress (Kant et al., 1995). En outre, l'exposition chronique à un (ou plusieurs) facteur stressant peut conduire l'organisme à ne plus être en mesure de produire une réponse adaptée car les systèmes de régulation mentionnés précédemment (rétrocontrôle négatif de la sécrétion de cortisol, adrénaline et noradrénaline) sont dépassés. Dans ce cas, il peut y avoir développement de pathologies telles que les troubles anxieux ou encore la dépression. Ces pathologies, et notamment la dépression, sont associées, chez l'homme, à une réduction de la latence, une augmentation de la quantité et de la densité de sommeil paradoxal (Kupfer, 1992). Chez les rongeurs, le stress par défaite sociale chronique est utilisé pour obtenir un modèle de dépression. En effet, à l'issue de cette procédure, les animaux développent des comportements de type dépressifs (Von Frijtag et al., 2000 ; Rygula et al., 2005 ; Huhman, 2006) ainsi que des altérations du sommeil paradoxal similaires à celles retrouvées chez l'homme ; à savoir, une augmentation de la durée et une réduction de la latence du sommeil paradoxal (Matsuda et al., 2021). De manière intéressante, ces altérations sont restaurées suite à un traitement par antidépresseurs (Matsuda et al., 2021).

2.2.2 Influence de divers paramètres (contrôlabilité, prédictibilité)

Contrôlabilité du stress

Des études ont évalué l'effet de la contrôlabilité d'un stress sur le sommeil. Pour ce faire, deux groupes d'animaux ont été utilisés ; chacun reçoit le même nombre de chocs électriques, mais dans un cas, les animaux peuvent y mettre fin et pas dans l'autre. Pour les deux groupes, une réponse au stress similaire est observée : les animaux montrent des niveaux de *freezing*, des taux plasmatiques de corticostérone (Shors et al. 1989) et une augmentation de la température corporelle (Yang et al. 2011) similaires. En revanche, les animaux exposés à un choc contrôlable présentent une augmentation de la quantité de sommeil paradoxal, tandis que les animaux exposés à un choc incontrôlable présentent une diminution de la quantité de sommeil paradoxal (Sanford et al., 2010). De même, chez des rats ayant reçu des chocs incontrôlables, une augmentation de la latence à l'endormissement et de la latence au sommeil paradoxal ont été observées, ainsi qu'une diminution du pourcentage de sommeil paradoxal (Vazquez-Palacios et Velázquez-Moctezuma, 2000). Une étude similaire a été réalisée de façon chronique pendant 14 jours. Uniquement les animaux du groupe de stress contrôlable ont montré une diminution de sommeil paradoxal qui perdurait jusqu'au septième jour de stress (Kant et al., 1995).

Prédictibilité du stress

La prévisibilité est un facteur important à considérer dans les effets du stress sur le sommeil. En effet, lorsque les rongeurs sont confrontés à des chocs qui peuvent leur être signalés par un indice (visuel ou auditif) ou non signalés, ils passent plus de temps dans la condition signalée/prévisible ; et cela peut importe si le choc est évitable ou inévitable (Badia et al., 1979). Une étude s'est intéressée aux effets de la prévisibilité d'un stress sur le sommeil chez des souris soumises à un entraînement avec des chocs évitables ou inévitables signalés par un indice auditif (Yang et al., 2011). Les auteurs ont observé une augmentation du sommeil paradoxal chez le groupe de souris recevant les chocs évitables signalés par rapport au groupe recevant les chocs inévitables signalés (Yang et al., 2011). À l'inverse, les souris recevant des chocs inévitables signalés présentaient une augmentation du sommeil lent. Une autre étude a montré que des souris exposées à des signaux auditifs prédictifs ou non lors d'un entraînement avec des chocs évitables présentaient également une augmentation du sommeil paradoxal après ce stress (Machida et al., 2013). Toutefois, un sous-groupe de souris n'est pas parvenu à améliorer ses performances d'évasion lors de la présentation du stimulus auditif prédictif et n'a pas non plus présenté d'augmentation du sommeil paradoxal, suggérant qu'il existe une composante d'apprentissage dans les modifications du sommeil paradoxal (Sanford et al., 2015).

En résumé à propos des effets du stress sur le sommeil :

- Le stress chronique correspond à un stress qui perdure dans le temps. Il peut entraîner un dépassement des systèmes de régulation et devenir pathologique, menant à différents troubles anxieux ou à la dépression.
- Différents paramètres du facteur de stress peuvent induire des effets divergents sur le sommeil : un stress contrôlable et/ou prédictible induit une augmentation de sommeil paradoxal, tandis qu'un stress incontrôlable induit une diminution de sommeil paradoxal.
- Diverses procédures de stress sont utilisées en laboratoire. Parmi les plus fréquentes, on retrouve : l'exposition à des chocs électriques ou la contention/immobilisation qui induisent une diminution de sommeil paradoxal. En outre, la contention/ immobilisation est généralement suivie d'un rebond sélectif de sommeil paradoxal qui

permet de compenser la perte induite par le facteur de stress. Le stress social induit également une suppression du sommeil paradoxal.

2.2.3 Le cas particulier de la défaite sociale

Présentation du protocole de défaite sociale

Les conflits sociaux comptent parmi les facteurs de stress les plus puissants (Lo Martire et al., 2020). En effet, ils induisent une sécrétion accrue de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et de corticostérones, les indicateurs classiques de la réponse au stress (Lo Martire et al., 2020). Le protocole de défaite sociale s'inspire directement de ces conflits sociaux, permettant ainsi de reproduire, dans les laboratoires, une situation stressante à laquelle les rongeurs peuvent être confrontés dans la nature.

On parle de défaite sociale lorsqu'un individu perd une confrontation avec un congénère (Hollis et Kabbaj, 2014). Ce protocole de stress se base sur le fait que les rongeurs sont des animaux territoriaux. En effet, l'intrusion d'un mâle inconnu sur le territoire d'un autre congénère mâle agressif aboutit quasi systématiquement à l'attaque de l'intrus par le résident (Goyens et Noirot, 1975). Classiquement, chez les souris, une souris CD1 est utilisée comme agresseur et une souris C57BL6, plus petite et plus jeune, est utilisée comme intrus (Berton et al., 2006). La défaite se caractérise par différents comportements tels qu'une posture de soumission (la souris est dressée sur ses deux pattes arrière), l'évitement, la fuite ou encore le *freezing* (Kudryavtseva et Bakshtanovskaya, 1991). Du côté de l'agresseur, la défaite se caractérise par l'intensification du combat, la poursuite de l'intrus à travers la cage ou encore des morsures (Kudryavtseva et Bakshtanovskaya, 1991). Cette phase de contacts physiques est généralement suivie d'une phase d'exposition sensorielle qui permet de prolonger le contact avec l'agresseur et ainsi maintenir la menace à travers des contacts visuels, olfactifs et auditifs sans que l'intrus puisse être attaqué physiquement.

Le stress par défaite sociale a été principalement utilisé dans une version chronique. Dans ce cas, la souris intrus est confrontée à une souris agresseur tous les jours pendant 10 (Berton et al., 2006) à 40 jours (Bartolomucci et al., 2001). À l'issue du protocole, les souris montrent généralement des altérations comportementales similaires aux symptômes de dépression chez l'homme tels que l'anhédonie ou l'évitement social (Berton et al., 2006 ; Hollis et al., 2010). À l'inverse, la défaite sociale aiguë correspond à une confrontation unique de quelques minutes (Berton al, 1999), ou à plusieurs interactions courtes dans la même journée

(Huhman et al., 2003), conduisant à des altérations comportementales similaires aux troubles de l'anxiété tels que l'évitement des bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevée (Berton al, 1999).

Effets du stress par défaite sociale sur le sommeil

À l'image d'autres protocoles de stress mentionnés précédemment, le stress par défaite sociale induit également des effets relativement variables sur le sommeil. Un récapitulatif des principales études s'intéressant aux effets de ce type de stress sur le sommeil est présenté dans le Tableau 2.1.

Suite au protocole de défaite sociale aiguë, constitué d'une phase de contact physique de quelques minutes, plusieurs études ont rapporté une diminution du sommeil et, en particulier, du pourcentage de sommeil paradoxal (Kamphuis et al., 2015 ; Antila et al., 2022 ; Smith et al., 2023 ; Henderson et al., 2017). Toutefois, malgré un protocole similaire, d'autres études rapportent, à l'inverse, une augmentation de sommeil paradoxal (Feng et al., 2020). Il est intéressant de noter que lorsque le protocole de stress par défaite sociale utilisé semble plus intense, c'est-à-dire que la phase de contacts physiques avec la souris agresseur est répétée plusieurs fois à intervalle régulier pendant environ une heure, une augmentation du sommeil paradoxal est observée (Yu et al., 2022 ; Fuji et al., 2019). Néanmoins, certaines études viennent contraster cette dissociation. En effet, Meerlo et Turek ont réalisé un stress aigu qui consiste en une phase de contacts physiques d'une heure avec une souris C57Bl6 comme agresseur (plutôt qu'une CD1). Malgré une unique phase de contact, celle-ci est longue et laisse la place à de nombreux conflits, constituant ainsi un stress relativement intense. Dans le sommeil qui suit, les auteurs ont observé une diminution forte et rapide du sommeil paradoxal suivie d'un rebond dans la période d'obscurité (Meerlo et Turek, 2001). La diminution du sommeil paradoxal est accompagnée d'une légère augmentation du sommeil lent pendant la période de lumière qui s'intensifie pendant la période d'obscurité (Meerlo et Turek, 2001).

De manière intéressante, cette dissociation des effets sur le sommeil paradoxal en fonction de l'intensité du protocole de défaite sociale semble également exister pour la version chronique du stress par défaite sociale. En effet, plusieurs études réalisent une phase de contacts physiques, suivie d'une phase d'exposition sensorielle à la suite de laquelle la souris intrus est remise dans sa cage. Ceci est effectué une fois par jour pendant au moins 10 jours. Dans ce cas, le protocole de stress induit une diminution de sommeil paradoxal (Henderson et al.,

2017 ; Page et al., 2016) ou pas d'effet (Grafe et al., 2020). À l'inverse, une augmentation de sommeil paradoxal est observée lorsque la souris intrus reste en contacts sensoriels jusqu'à la prochaine phase de contacts physiques (c'est-à-dire le jour suivant ; Matsuda et al., 2011 ; Wells et al., 2017). Dans ce cas, la mise en contact avec l'agresseur est bien plus importante, faisant de cette variante du protocole un stress probablement plus intense.

En résumé à propos de la défaite sociale :

- Il s'agit d'une procédure qui se base sur la nature territoriale des rongeurs et exploite la relation résident-intrus. Ainsi, ce protocole de stress mime une situation stressante naturelle (pour les rongeurs).
- Le protocole de défaite sociale induit une puissante réponse au stress avec des taux élevés de libération de corticostérones.
- Une majorité des études utilisant cette procédure observe une diminution de sommeil paradoxal, bien que certaines spécificités dans le protocole puissent également conduire à une augmentation de sommeil paradoxal. Cette divergence semble être liée à l'intensité du stress.

En conclusion, le stress est une réponse adaptative complexe à un changement, une menace perçue dans l'environnement. Cette réponse peut prendre différentes formes en fonction de l'individu ; mais elle dépend également du facteur l'ayant déclenchée. Le stress perturbe grandement l'architecture du sommeil et, en particulier, celle du sommeil paradoxal, entraînant des modifications parfois opposées. À titre d'exemple, nous avons vu que l'exposition à un conflit social induit généralement une diminution de sommeil paradoxal alors que des confrontations répétées induisent une augmentation de sommeil paradoxal. Les effets du stress sur le sommeil sont donc hétérogènes et soulignent le besoin de caractériser finement les différentes modifications induites par un stress et d'identifier les potentielles structures cérébrales candidates capables de détecter le facteur de stress et d'induire les changements qui sont observés dans l'architecture du sommeil.

RÉFÉRENCE	ESPÈCE/ LIGNÉE	PROTOCOLE	AIGUE/ CHRONIC	HEURE	EFFET REM	EFFET NREM
Fujii et al. 2019	C57	60 min au total. Paroi pendant 5 min pour contacts sensoriels, puis retirée et remise dès nouvelle attaque. Étape répétée 2, 4 ou 8 fois (à 25, 15 ou 7 min d'intervalle).	A	Fin période light	↑ quantité en période dark (seulement pour la condition 4 phases de défaite). ↑ (légère) durée moyenne des épisodes (seulement pour la condition 4 phases de défaite).	↑ quantité en période dark. ↑ nombre d'épisodes (seulement pour la condition 4 phases de défaite).
Feng et al., 2020	C57	10 min de contacts physiques (pour 10-15 conflits au total).	A	Début période dark	↑ pourcentage en période dark et light (effet plus fort en fin période dark).	↑ pourcentage (en période dark mais pas light). Effet plutôt début période dark.
Yu et al., 2022	C57	60 min au total décomposées en : 5 min de contacts physiques puis 10 min de contacts sensoriels, répété 4 fois à 15 min d'intervalle	A	Fin période dark	↑ pourcentage (légère). Pas de différence durée des épisodes.	↑pourcentage (forte).↑ durée des épisodes.
Antila et al., 2022	DBH-, TH-Cre	5-10 min contacts physiques (jusqu'à 10 conflits) puis paroi pendant tout le sommeil qui suit	A	Début période light	↓ pourcentage (forte).	↓ pourcentage.
Smith et al., 2023	VGLUT-, VGAT-, CCK-, TAC1-Cre	5-10 min contacts physiques (jusqu'à 10 conflits) puis paroi pendant tout le sommeil qui suit	A	Début-milieu période light	↓ pourcentage (forte). Tendance diminution de la durée des épisodes. ↓ nombre d'épisode.	↓ pourcentage (légère). ↓ durée des épisodes (forte). ↑ nombre d'épisode (forte).
Kamphuis et al., 2015	Rats (WTG)	60' au total. Contacts jusqu'à défaite puis paroi pour le temps restant	A	Milieu période light	↓ pourcentage début période light (pendant les deus premières heures). ↑ pourcentage en période dark.	Pas de différence.
Meerlo et Turek, 2001	C57	60 minutes de contacts physiques (la souris aggressive est une C57 plus âgée et plus imposante).	A	Début-milieu période light	↓ pourcentage début période light (puis rebond pendant la période dark).	↑pourcentage (légère en période light et plus importante en période dark).
Henderson et al., 2017	C57	5 min de contacts physiques suivit de 20 min de contacts sensoriels (avec la paroi)	A/C	Début période light	**A** ↓ pourcentage début période light (3 premières heures), pas de différence dans la période light qui suit. ↓ nombre d'épisodes. Pas d'effet durée. ↑ pourcentage et nombre en période dark.	**A** ↓ pourcentage début période light (3 premières heures), pas de différence dans la période light qui suit. ↑ pourcentage et nombre en période dark
					C ↓ pourcentage début période light (3 premières heures), pas de différence dans la période light qui suit. ↑ pourcentage et nombre d'épisodes en période dark.	**C** Pas de différence en période light. ↑ pourcentage et nombre d'épisodes en période dark.
Kinn et al., 2008	Rats (Wistar)	2 défaites sociales (2 jours consécutifs). 10s à 2 min de contacts physiques puis paroi après défaite pour 1h.	A (« prolongé »)	Début période dark	Pas effet.	↑ durée totale et nombre d'épisodes.
Wells et al., 2017	C57	10 min contacts physiques puis paroi pour le reste du temps (jusqu'à nouvelle défaite avec nouvelle CD1).	C	Début période light	↑ pourcentage et nombre (forte) pendant les 10j de SDS. Pas de différence pourcentage et légère ↑ nombre d'épisodes pendant 5j post SDS.	↑ pourcentage pendant les 10j de SDS. Pas de différence pendant les 5j post SDS.
Page et al., 2016	Rats (F344)	Contacts jusqu'à défaite ou 5 attaques puis paroi (mesh) pendant 1h. Répété 3-4 fois par semaine pendant 4 semaines.	C	Période dark	↓ pourcentage et nombre d'épisodes pendant la période light. Légère ↓ pourcentage, nombre et durée des épisodes en période dark.	Pas de différence.
Grafe et al., 2020	Rats	1-3 min de contacts physiques jusqu'à défaite. 30 min paroi (mesh). Si pas de conflits : contacts physiques pendant 15 min puis paroi 15 min.	C	Début période light	Pas de différence en pourcentage (ni période light ou dark).	Pas de différence en période dark. ↓ pourcentage en période light.
Matsuda et al., 2011	Rats (SD)	10 min contacts physiques puis paroi pendant 24h pendant 5 jours suivi de 2 jours de contacts sensoriel uniquement répété 2 fois pour un total de 14 jours.	C	x	↑durée totale et nombre d'épisodes.	↓ durée totale.

Tableau 2.1. Récapitulatif des effets d'un stress par défaite social sur le sommeil

Chapitre 3 : Vers un lien entre stress et sommeil : implication de la voie reliant le cortex préfrontal au noyau préoptique ventrolatéral

Au cours des deux premiers chapitres d'introduction, j'ai présenté ce qu'est le sommeil et comment sa régulation peut être altérée par le stress. Un des principaux objectifs de ma thèse était de tenter d'en préciser les mécanismes ; notamment à travers l'identification de substrats neuronaux capables de médier les modifications du sommeil induites par un stress par défaite sociale. Dans ce chapitre, je présenterai donc le cortex préfrontal (PFC) qui est une structure de haut niveau capable d'intégrer un large nombre d'informations liées à la fois à l'environnement extérieur, mais aussi à l'état interne d'un individu. Il est également capable de moduler l'activité d'un grand nombre de structures sous-corticales, et notamment le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO). Nous verrons que ce petit noyau hypothalamique est une structure clé dans la régulation du sommeil. Cette voie anatomique PFC-VLPO n'a été que peu étudiée et mes travaux de thèse révèlent qu'elle joue un rôle clé dans la modulation des effets du stress sur le sommeil.

3.1 Le noyau préoptique ventrolatéral : une structure clé du sommeil

3.1.1 Découverte du VLPO comme structure clé du sommeil

C'est l'équipe de Saper qui identifie le VLPO comme un véritable centre du sommeil (Sherin et al., 1996). Ce petit noyau hypothalamique contient une forte densité de neurones actifs pendant le sommeil qui se traduit par une fréquence de décharge élevée pendant le sommeil par rapport à l'éveil (Sherin et al., 1996 ; Szymusiak et al., 1998 ; Takahashi et al., 2009) (Figure 3.1B,C). Toutefois, une petite partie des neurones du VLPO enregistrée a également montré un profil actif durant l'éveil (Takahashi et al., 2009). Les résultats de ces expériences électrophysiologiques sont corrélés avec les preuves anatomo-fonctionnelles ayant mis en évidence une accumulation de la protéine c-Fos pendant le sommeil, mais pas lors d'un éveil prolongé (Sherin et al., 1996 ; Gvilia et al., 2006 ; Gaus et al., 2002) (Figure 3.1A). Plus tard, d'autres études par enregistrements unitaires ont montré que les neurones du VLPO étaient actifs pendant la privation de sommeil (Alam et al., 2014) ce qui est en contradiction avec les études par marquage c-Fos mentionnées. Afin de démontrer que les neurones du VLPO sont

nécessaires pour favoriser le sommeil, des lésions bilatérales spécifiques du VLPO ont été effectuées chez le rat et ont induit une diminution d'environ 40 à 50 % de la durée totale de sommeil ainsi qu'une fragmentation qui persistait jusqu'à plusieurs mois après la chirurgie (Lu et al., 2000). Par la suite, les approches par lésions ont été répliquées dans plusieurs études permettant ainsi d'établir clairement le rôle des neurones du VLPO comme nécessaire au maintien du sommeil (Arrigoni et al., 2009). Toutefois, même si les animaux présentent une forte diminution du temps de sommeil, celui-ci n'est pas totalement aboli. Finalement, ces résultats sont cohérents avec de plus récentes études ayant identifié d'autres systèmes favorisant le sommeil comme les neurones nNos du cortex ou la zone parafaciale (voir Chapitre 1) (Scammel et al., 2017 ; McGinty et al., 2004 ; Anaclet et al., 2017 ; Saper et al., 2017) et pourraient, au moins en partie, compenser la perte des neurones du VLPO.

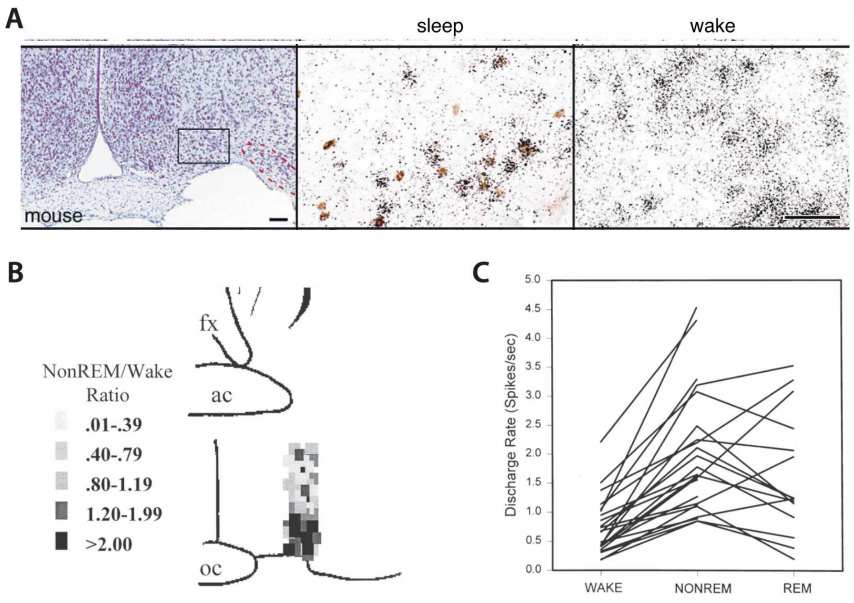


Figure 3.1. Le VLPO contient des neurones actifs pendant le sommeil lent
A. Neurones galaninergiques mis en évidence par hybridation *in situ* (grains noirs) dans le VLPO. Comme le montre l'immunomarquage cFos (grains marrons), ces neurones sont actifs après au moins une heure de sommeil (au centre) et inactifs après au moins une heure d'éveil (à droite). *Extrait de Gaus et al., 2002*. **B.** Des enregistrements unitaires de neurones dans la région préoptique montrent que le VLPO contient la plus forte densité de neurones plus actifs pendant le sommeil lent que pendant l'éveil. **C.** La fréquence de décharge des neurones du VLPO est maximale pendant le sommeil lent. Toutefois, certains neurones sont également actifs pendant le sommeil paradoxal, alors que d'autres retrouvent une fréquence de décharge plus faible et similaire à celle observée pendant l'éveil. *Extrait de Szymusiak et al., 1998.*

3.1.2 Diversité cellulaire et connectivité du VLPO

Une majorité des neurones du VLPO sont actifs pendant le sommeil, projettent au TMN (Sherin et al., 1996 ; Gaus et al., 2002) et co-expriment le GABA et la Gal. Cependant, la composition cellulaire du VLPO est plus complexe. En effet, on retrouve également des neurones GABA dépourvus de Gal ainsi que des neurones glutamatergiques. Dans cette section, nous aborderons ces différentes populations.

Les neurones GABAergiques du VLPO

Le VLPO contient une majorité de neurones GABAergiques, comme l'indique l'importante expression du transporteur vésiculaire GABA (Arrigoni et Fuller, 2022). Cependant, au moins deux sous-populations distinctes ont été identifiées (Gallopin et al., 2000). La première regroupe les neurones du VLPO qui co-expriment la galanine (notés GABA/Gal). Ils sont actifs pendant le sommeil et sont directement inhibés par des afférences favorisant l'éveil (Alam et al., 2014 ; Gaus et al., 2002 ; Gallopin et al., 2005 ; Chauveau et al., 2020). Une section lui sera dédiée ci-dessous. La seconde regroupe les neurones GABAergiques dépourvus de Gal (noté GABA).

Contrairement aux neurones classiques promoteurs de sommeil (GABA/Gal), ces neurones GABA locaux sont excités par les afférences favorisant l'éveil comme l'ORX en provenance de l'hypothalamus latéral (LH), l'histamine en provenance du TMN ou encore la NA en provenance du LC (Gallopin et al., 2000 ; Liu et al., 2010 ; Liang et al., 2021). Ainsi, ces neurones GABA du VLPO pourraient inhiber localement les neurones promoteurs de sommeil afin d'induire l'éveil (Liu et al., 2010 ; Liang et al., 2021) formant ainsi un mécanisme d'inhibition supplémentaire et synergique.

Les neurones GABA/galaninergiques : les neurones promoteurs du sommeil du VLPO

Les neurones GABA/Gal sont les principaux neurones du VLPO, représentant environ deux tiers des neurones de cette structure. Ils ont été largement caractérisés *ex vivo* et plusieurs propriétés électrophysiologiques ont été mises en évidence pour les identifier (Gallopin et al., 2000). Parmi elles, on retrouve la présence d'un LTS, l'hyperpolarisation par la noradrénaline, l'acétylcholine et la sérotonine, ainsi qu'une forme caractéristique triangulaire (Gallopin et al., 2000) (Figure 3.2A). La Gal est un peptide inhibiteur qui, lors de sa colibération avec le GABA, est susceptible de contribuer à l'inhibition des neurones favorisant l'éveil (Kask et al.,

1995 ; Pieribone et al., 1995). Cette idée est soutenue par les résultats d'études électrophysiologiques *in vitro* montrant que le LC, le TMN, le DR et les neurones à ORX sont tous inhibés par la Gal (Pieribone et al., 1995 ; Schonrock et al., 1991 ; Goforth et al., 2014). D'autant plus que toutes ces régions reçoivent des projections du VLPO (Sherin et al., 1998 ; Kroeger et al., 2018 ; Luppi et al., 1995). Bien que la Gal soit un bon marqueur cellulaire pour identifier les neurones favorisant le sommeil dans le VLPO (Gaus et al., 2002), sa contribution à la signalisation reste floue (Arrigoni et al., 2002).

Comme nous l'avons vu dans cette section (ainsi que succinctement dans le Chapitre 1), les neurones GABA/Gal du VLPO reçoivent des afférences inhibitrices directes de l'ensemble des centres responsables de l'éveil. Ces neurones promoteurs de sommeil sont également indirectement inhibés par les signaux de l'éveil via un intermédiaire local constitué des interneurones GABA locaux (Liu et al., 2010 ; Liang et al., 2021 ; Arrigoni et Fuller, 2022). Il a également été montré que les neurones GABA/Gal du VLPO sont fortement inhibés par les agonistes cholinergiques (Gallopin et al., 2000 ; Saint-Mleux et al., 2004). En revanche, la source de ces entrées cholinergiques dans le VLPO reste floue. En effet, les études de traçage rétrograde à partir du VLPO ont montré que les entrées cholinergiques dans le VLPO sont rares, voire inexistantes (Chou et al., 2002). Enfin, il a été montré que l'activation des neurones GABA du LH induit rapidement l'éveil, même à partir d'un sommeil profond, et que cet effet est dû à l'inhibition des neurones GABA/Gal du VLPO (Venner et al., 2016). Ces résultats offrent pour la première fois une preuve d'un apport inhibiteur direct non-aminergique et non cholinergique, capable de « désactiver » efficacement les neurones favorisant le sommeil du VLPO afin d'induire l'éveil.

En outre, de plus récentes études ont mis en évidence que le VLPO est constitué d'une hétérogénéité cellulaire bien plus importante (Figure 3.3). En effet, plusieurs peptides ont été identifiés au sein de la population de neurones promoteurs de sommeil du VLPO : la cholécystokinine (CCK), le CRH, la tachykinine (TAC), la dynorphine A ou encore la substance P (Chung et al., 2017 ; Moffitt et al., 2018). Ces populations ont été identifiées sur la base de leur nature GABAergique et de leurs projections vers le TMN ; il n'est toutefois pas clair de savoir si ces neurones correspondent bien aux neurones GABA/Gal du VLPO. De plus, le rôle respectif de chacune de ces sous-populations, ainsi que le rôle propre du peptide qu'elles expriment, restent à déterminer.

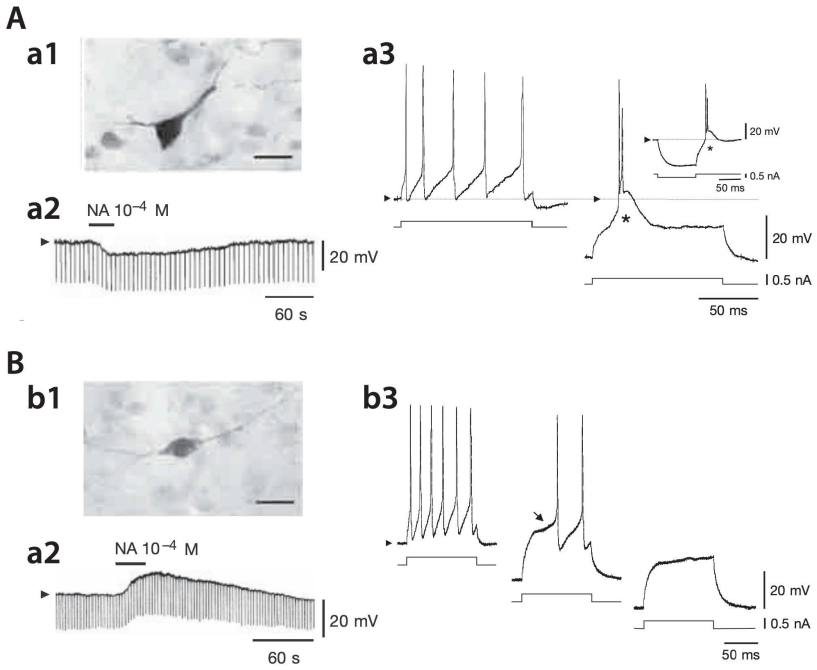


Figure 3.2. Caractérisation *ex vivo* des neurones du VLPO
Le VLPO est composé de deux grandes populations de neurones qui peuvent être dissociées selon des critères morphologiques, électrophysiologiques et selon leur réponse à l'application de noradrénaline (NA). La première sous-population majoritaire est constituée de neurones triangulaires (**a1**), possède un potentiel calcique à bas seuil (*low threshold spike*, LTS, **a3**) et est inhibée par la NA (**a2**). Elle correspond aux neurones promoteurs de sommeil lent. La seconde population, minoritaire, est constituée de neurones bipolaires (**b1**), dépourvus de LTS (**b3**) et est excités par la NA (**b2**). *Adapté de Gallopin et al., 2000.*

Les neurones glutamatergiques du VLPO

Le VLPO contient également des neurones glutamatergiques, comme l'indique l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Arrigoni et Fuller, 2022). L'activation des neurones glutamatergiques du VLPO supprime le sommeil, retarde le sommeil paradoxal et consolide l'éveil jusqu'à une heure (Vanini et al., 2020). De même, l'activation par optogénétique de ces neurones induit une transition rapide du sommeil lent à l'éveil (Chung et al., 2017). L'ensemble de ces résultats suggère que les neurones glutamatergiques du VLPO jouent un rôle dans la régulation de l'éveil. Les mécanismes par lesquels ils pourraient exercer ce rôle ne sont pas bien connus, mais certaines études suggèrent qu'ils pourraient l'exercer par leurs projections vers le TMN (Chung et al., 2017).

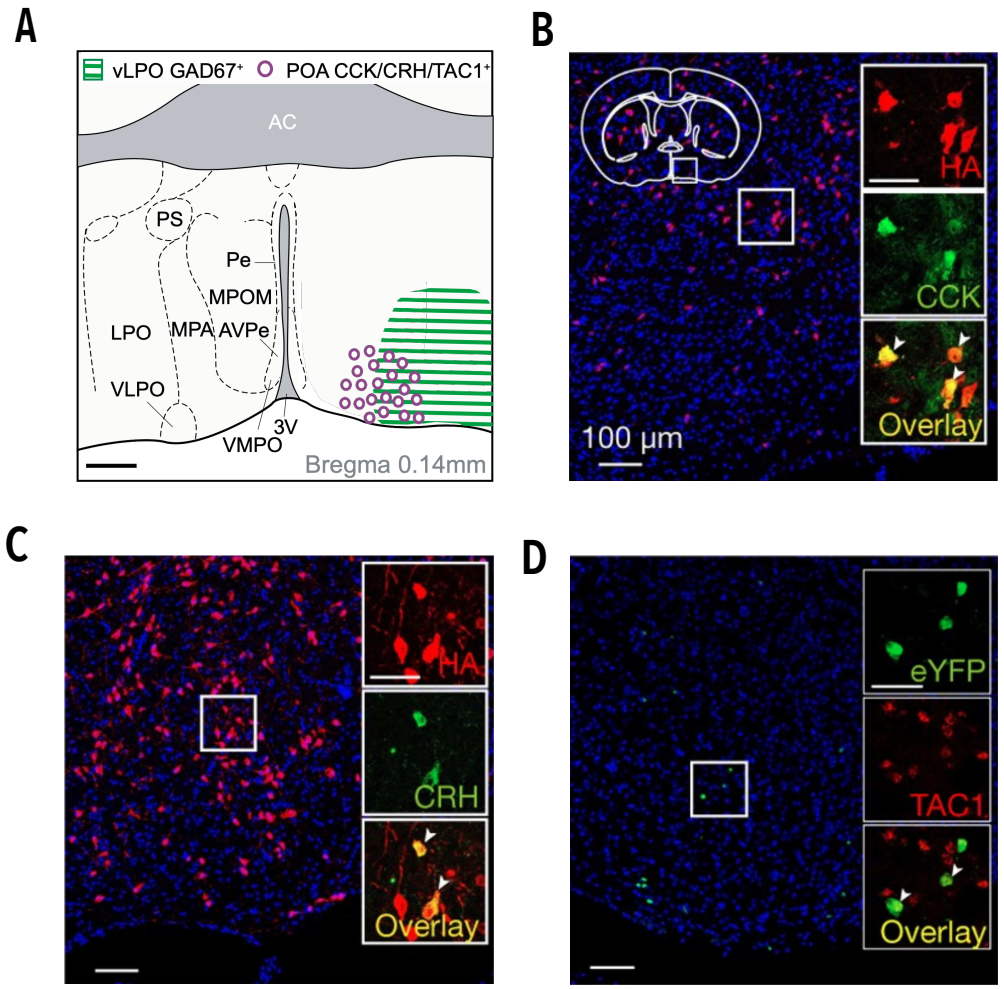


Figure 3.3. Le VLPO contient une large diversité cellulaire
A. Représentation schématique illustrant la distribution spatiale des populations neuronales définies par leur profil moléculaire. *Adapté de Siemens et Kamm, 2018*. Les populations neuronales nouvellement identifiées (exprimant les peptides CCK, CRH et TAC1) chevauchent, au moins en partie, la population de neurones GABA du VLPO. **B-D.** Chevauchement entre le marquage HA (ou eYFP) qui permet d'identifier les neurones GABA de la région préoptique projetant au TMN et l'expression de la CCK (**B**), CRH (**C**) et TAC1 (**D**). *Extrait de Chung et al., 2017*. GAD67, isoforme 67 de la glutamate décarboxylase ; CCK, cholécystokinine ; CRH, corticolibérine ou *cortico-releasing-hormone* ; TAC1, tachykinine 1 ; TMN, noyau tubéromamillaire.

3.1.3 Rôle du VLPO dans la mise en place du sommeil

Les nombreuses projections inhibitrices réciproques entre le VLPO et les centres de l'éveil ont conduit à la conceptualisation du modèle *flip-flop switch* (Saper et al., 2001), plaçant le VLPO comme le centre déclencheur du sommeil. Ainsi, chaque pôle (éveil ou sommeil) fait pencher la balance à son avantage en inhibant l'activité du second. De cette manière, le modèle

garantit des états comportementaux stables et des transitions rapides entre éveil et sommeil.
Bien que largement admis, ce modèle a tout de même reçu certaines critiques. En effet, un défaut de ce modèle est que si l'un des deux pôles (éveil ou sommeil) est affaibli, alors il devient moins capable d'inhiber l'autre pôle, le rendant plus susceptible à de petites perturbations et pouvant donner lieu à des états intermédiaires indésirables (Arrigoni et Fuller, 2022). À titre d'exemple, une dégénérescence des neurones du VLPO produirait un moins fort tonus inhibiteur sur les centres d'éveil, ce qui conduirait à une fragmentation du sommeil et des siestes fréquentes pendant la journée, qui s'avèrent être des plaintes fréquentes chez les personnes âgées (Lim et al., 2014 ; Arrigoni et Fuller, 2022). De plus, les transitions comportementales ne sont pas toujours aussi rapides que le prédit le modèle *flip-flop switch*, mais elles se produisent souvent progressivement, en quelques minutes plutôt qu'en quelques secondes (Arrigoni et Fuller, 2022). Enfin, le modèle *flip-flop switch* ne prend pas en considération la possibilité que d'autres groupes de neurones, en dehors des neurones cholinergiques et monoaminergiques qui innervent le VLPO, puissent également contribuer à la régulation veille-sommeil. Quelques rares études ont pu mettre en évidence que le VLPO est également sous un contrôle GABAergique en provenance du LH pour induire de l'éveil (Venner et al., 2016) ou encore sous contrôle glutamatergique en provenance du PFC pour induire le sommeil (Su et al., 2024).

3.1.4 VLPO et régulation du sommeil paradoxal

Bien que le VLPO soit majoritairement associé à la régulation du sommeil lent, de plus en plus d'études rapportent également des effets associés au sommeil paradoxal.
Initialement, c'est la sous-partie, anatomiquement plus dorsale et plus médiale du VLPO, l'eVLPO (pour extended VLPO), qui a été associée à la régulation du sommeil paradoxal. En effet, il existe une corrélation entre la perte de neurones (lésions) dans l'eVLPO et la diminution de la quantité de sommeil paradoxale chez le rat (Lu et al., 2000). À l'inverse, dans des conditions déclenchant un enrichissement du sommeil paradoxal (suite à des périodes d'obscurité prolongées), le nombre de cellules c-Fos-positives dans l'eVLPO était fortement corrélé avec la quantité de sommeil paradoxal (Lu et al., 2002). Néanmoins, il s'agit d'études purement corrélatives et, plus récemment, d'autres études ont rapporté des effets spécifiques du sommeil paradoxal suite à des enregistrements et/ou manipulations des neurones du VLPO (dans sa partie centrale).
En effet, plusieurs études ont utilisé l'imagerie calcique, associée à l'EEG, afin d'enregistrer

l'activité des neurones du VLPO au cours du cycle éveil-sommeil. Une première étude a montré une augmentation de la fluorescence GCaMP par fibre photométrique dans les neurones Gal du VLPO pendant le sommeil paradoxal (Luo et al., 2022). Une seconde, a mis en évidence qu'environ 21 % des neurones GABA du VLPO ont été catégorisés comme actifs pendant le sommeil paradoxal puisque la fluorescence GCaMP enregistrée grâce au miniscope était maximale pendant le sommeil paradoxal (Kostin et al., 2023). Ces résultats sont cohérents avec ceux d'une autre étude ayant effectué des enregistrements électrophysiologiques des neurones GABA du VLPO qui projettent au TMN (Chung et al., 2017). En effet, ces neurones étaient principalement actifs pendant le sommeil et présentaient un taux de décharge maximal pendant le sommeil paradoxal. Cette même étude a également montré que l'activation optogénétique des neurones GABA du VLPO projetant au TMN induit une augmentation de sommeil lent ainsi qu'une augmentation, plus modérée, de sommeil paradoxal. À l'inverse, l'inhibition par chémogénétique de cette même population de neurones induit une diminution de sommeil lent ainsi qu'une diminution encore plus forte de sommeil paradoxal (Chung et al., 2017). Une autre étude s'est intéressée aux neurones Gal du VLPO, qui correspondent probablement aux neurones GABA projetant au TMN de la précédente étude, puisqu'environ 85 % des neurones de la POA qui projettent au TMN expriment Gal (Sherin et al., 1998). Les auteurs ont montré que leur inhibition par optogénétique n'a aucun effet ; en revanche, l'activation par chémogénétique induit une augmentation de sommeil lent pendant la période de lumière, qui, de manière intéressante, est accompagnée d'une forte suppression du sommeil paradoxal ainsi qu'une augmentation de la latence au sommeil paradoxal (Kroger et al., 2018). Les résultats de ces deux dernières études semblent diverger, mais peuvent s'expliquer, au moins en partie, par des points méthodologiques. En effet, concernant les manipulations optogénétiques, les fréquences de stimulation étaient différentes. De plus, ces différences peuvent également s'expliquer par des différences de techniques employées : tandis que l'optogénétique est une technique permettant d'entraîner de manière rhythmique les neurones ciblés, la chémogénétique rend les neurones plus sensibles aux potentielles entrées naturelles, pouvant expliquer les différences sur le sommeil paradoxal (Kroeger et al., 2018).

En résumé à propos du VLPO :

- Le VLPO est la structure du sommeil par excellence. Il contient une majorité de neurones GABA/Gal promoteurs de sommeil qui, grâce à leurs projections inhibitrices

vers les centres de l'éveil, induisent le sommeil. Il joue donc un rôle primordial dans le modèle *flip-flop switch* pour expliquer l'alternance éveil-sommeil.

- Plusieurs signaux d'éveil (histamine, ORX, NA) peuvent à la fois inhiber directement les neurones promoteurs de sommeil du VLPO mais également de manière indirecte via un relais formé par des interneurones GABA locaux qui permettent de renforcer l'inhibition des neurones promoteurs de sommeil.
- Le VLPO contient une large diversité de sous-populations. Différents marqueurs ont été identifiés pour les cibler plus spécifiquement (CRH, CCK, TAC, Substance P). Le rôle spécifique de ces sous-populations (ou des peptides eux-mêmes qui sont probablement colibérés) dans la régulation du sommeil n'est pas connu.
- Le modèle *flip-flop switch* ne considère pas la modulation du VLPO par des structures autres que monoaminergiques ou cholinergiques, alors que quelques preuves (notamment une modulation GABA du LH ou glutamatergique du PFC) commencent à émerger.

3.2 Le cortex préfrontal : un lien entre stress et sommeil

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, répondre aux menaces (réelles ou potentielles) de l'environnement nécessite la mise en place coordonnée des systèmes autonomes, neuro-endocriniens et comportementaux (McKlveen et al., 2015) afin de favoriser une réponse adaptée et donc la survie. Un bon candidat capable d'intégrer l'ensemble de ces informations est le PFC. En effet, la connectivité du PFC avec le reste du cerveau le rend idéalement positionné pour orchestrer des fonctions d'ordre supérieur. Nous ne décrirons pas ce vaste réseau en détail. Cependant, plusieurs voies particulièrement pertinentes pour cette thèse méritent d'être soulignées.

3.2.1 Organisation anatomique générale du PFC

Le cortex préfrontal (PFC) est situé dans la partie antérieure du lobe frontal en avant des aires motrices et prémotrices (Carlén, 2017). Le PFC est principalement composé de neurones pyramidaux de nature glutamatergique (~80 à 90 %) et de populations d'interneurones locales (~10 à 20 %). L'ensemble de ces cellules est organisé en couches au sein desquelles

les neurones reçoivent à la fois des afférences longue distance en provenance de structures sous-corticales, mais également des connexions locales (Van De Werd et al., 2010). Sur le plan phylogénétique, le PFC est l'un des cortex les plus récents à se développer (Fuster, 2001). En effet, le PFC atteint une croissance maximale dans le cerveau humain où il représente environ un tiers du néocortex. Cet important développement, chez l'humain et les primates, soulève la question de son homologie avec celui d'autres mammifères comme les rongeurs (Laubach et al., 2018 ; Preuss, 1995).

Aujourd'hui, le PFC est essentiellement défini comme la partie du cortex cérébral qui reçoit les projections du noyau médiodorsal du thalamus (Fuster, 1997 ; Carlen 2017). Ce concept est né de l'observation que ce noyau thalamique cible une zone frontale restreinte du cortex à la fois chez les primates, mais aussi chez d'autres mammifères (Rose et Woolsey, 1949). Par conséquent, lorsque nous étudions le PFC chez le rongeur, nous étudions des régions fonctionnellement et anatomiquement analogues au PFC ventromédian, une région clé de l'intégration émotionnelle chez les primates. Le PFC du rongeur peut être décomposé en trois sous-régions : cingulaire, prélimbique et infralimbique (Figure 3.4). Ces trois sous-régions constituent un gradient fonctionnel dorso-ventral : la partie la plus ventrale, dite infralimbique (IL), est impliquée dans le contrôle émotionnel et mnésique des comportements ; tandis que la partie la plus dorsale, dite prélimbique (PL), est davantage impliquée dans la composante motrice des actions (Euston et al., 2012).

3.2.2 Connectivité du PFC : un hub entre stress et sommeil

Connexions vers des structures du stress

En plus de connexions cortico-corticales, le PFC est largement connecté à l'ensemble du cerveau et une grande partie de ses connexions vers des structures sous-corticales sont réciproques (Fuster, 1997). Parmi elles, le PFC projette massivement vers l'amygdale (Vertes, 2004), une structure du système limbique, impliquée dans les comportements émotionnels et notamment les réponses de peur (Le Doux, 1993 ; Quirk et Mueller, 2008). Le PFC peut donc directement moduler l'activité de ce noyau et également recevoir des informations de sa part ; il n'est donc pas surprenant que le PFC soit extrêmement sensible aux situations stressantes (Arnsten, 2015). Une autre connexion importante concerne la substance grise périaqueducale (PAG) qui est notamment impliquée dans l'agressivité, les comportements défensifs et la modulation de la douleur (Nelson et Trainor, 2007 ; Sewards et Sewards,

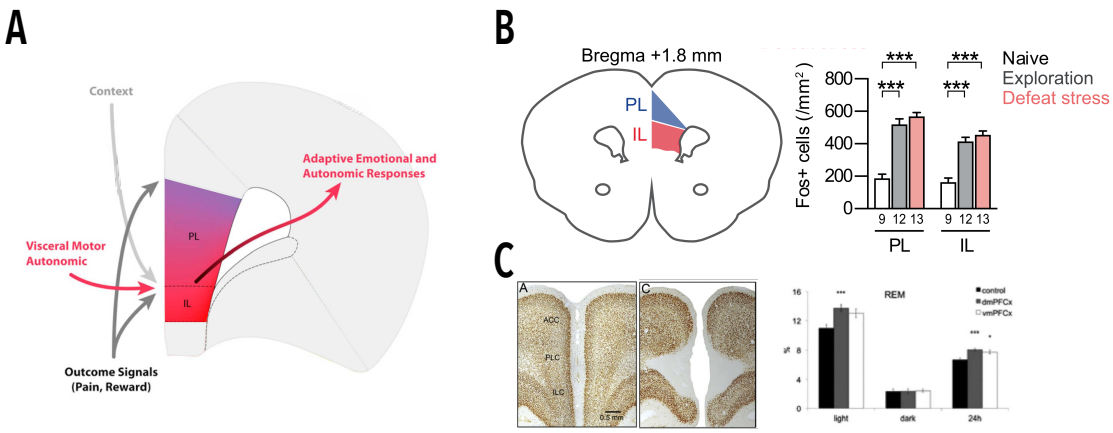


Figure 3.4. Organisation et rôle des régions infralimbique (IL) et prélimbique (PL) du cortex préfrontal en lien avec la régulation du stress et du sommeil
A. Représentation schématique du rôle des entrées et sorties des régions IL et PL du cortex préfrontal. *Adapté de Euston, 2012.* **B.** Quantification du nombre de cellules c-Fos dans les régions IL et PL du PFC chez le groupe naïf, le groupe d'exploration et le groupe de défaite sociale. *Extrait de Numa et al., 2019*. **C.** Gauche : histologie du PFC pour une souris contrôle recevant une injection de saline et pour une souris avec lésions des parties IL et PL du PFC recevant une injection d'acide iboténique. Droite : pourcentage de sommeil paradoxal pendant la période de lumière, d'obscurité et sur 24 pour les souris contrôles (noir), les souris ayant une lésion de la partie dorsale du PFC (dmPFC, gris) ou de la partie ventrale du PFC (vmPFC, blanc) correspondant aux régions IL et PL. *Adapté de Chang et al., 2014*

2002). Le PFC fournit également le principal apport cortical à l'habenula latérale, une zone impliquée dans les réponses apprises à la douleur, au stress, à l'anxiété, mais également à la récompense (Hikosaka, 2010). De plus, le PFC a des connexions bidirectionnelles avec un large éventail de systèmes neuromodulateurs, notamment le DR, la VTA et le LC, qui jouent un rôle important dans les réponses adaptatives aux événements récompensants et stressants (Itoi et Sugimoto, 2010 ; Maier et Watkins, 2005). Grâce à ses connexions au LC, le PFC peut également réduire la réponse au stress (Amat et al., 2006) via un contrôle inhibiteur sur les neurones noradrénergiques du LC (Sara et Herve-Minvielle, 1995). Le PFC semble également pouvoir moduler la réponse au stress grâce à des projections vers le PVN, qui est un des premiers acteurs de l'axe HPA (voir Chapitre 2), permettant ainsi une rétroaction négative afin de diminuer la réponse au stress (Radley et al., 2006 ; 2008). Enfin, il existe une voie réciproque importante entre le PFC et l'hippocampe qui permet le transfert d'informations complexes liées à l'environnement entre les deux régions (Holmes et Wellman, 2008).

Connexions vers des structures du sommeil

Le PFC est fortement interconnecté avec le tronc cérébral, l'hypothalamus et le thalamus (Hoover et Vertes, 2007 ; Vertes, 2004), impliqués dans la régulation veille-sommeil (voir Chapitre 1). Plus particulièrement, le PFC projette sur les neurones pontiques (dont la vlPAG ; Hurley et al, 1991 ; Vertes, 2006) impliqués dans le contrôle du sommeil paradoxal. Le PFC projette également sur l'hypothalamus latéral, y compris sur les neurones ORX, et dans le TMN (Wouterlood et al, 1987 ; Yoshida et al, 2006). Il a été proposé que cette voie pourrait être à l'origine de la fragmentation du sommeil observée notamment suite à des lésions de la partie ventro-médiale du PFC (Chang et al., 2014). Le PFC, et plus particulièrement sa région IL, projette également sur un autre principal centre du sommeil, le VLPO. En effet, l'injection d'un traceur antérograde au niveau de la région IL a permis d'identifier des fibres marquées au niveau du VLPO chez le rat (Chou et al. 2002). Plus récemment, ces données ont été confirmées chez la souris puisque l'injection d'un traceur rétrograde, au niveau du VLPO, a permis d'identifier des neurones marqués au niveau de la région IL du PFC (Su et al., 2024).

3.2.3 Rôle du PFC dans la régulation du sommeil

Le PFC a été associé au sommeil lent et notamment à la genèse des ondes lentes qui sont nombreuses au sein de cette structure (Massimini et al., 2004). Aussi, une atrophie du PFC induit une diminution de l'activité par ondes lentes (slow wave activity ; Mander et al., 2013). Une récente étude suggère que le PFC, en particulier via ses projections vers le VLPO, participe également à la régulation des quantités de sommeil lent (Su et al., 2024). En effet, les auteurs ont mis en évidence que la stimulation transcrânienne réduit l'insomnie chez les souris et que cet effet semble en partie médié par la voie PFC-VLPO. De plus, des lésions du PFC induisent une fragmentation accrue du sommeil lent ainsi qu'une augmentation du pourcentage de sommeil paradoxal (Chang et al., 2014). Ces résultats suggèrent que le PFC serait également impliqué dans la régulation du sommeil paradoxal. En lien avec cette idée, plusieurs études ont mis en évidence une forte activation du PFC pendant le sommeil paradoxal à la fois chez la souris (Hong et al., 2023) et chez l'humain (Braun et al., 1997 ; Maquet et al., 1996). De plus, il a été montré que le PFC est causalement impliqué dans la régulation du sommeil paradoxal puisque l'activation des cellules pyramidales par optogénétique promeut le sommeil paradoxal et, à l'inverse, leur inhibition le supprime (Hong et al., 2023). Cette étude met donc en avant un contrôle descendant du PFC sur le

sommeil paradoxal, et plus précisément, ce contrôle s'effectuerait via les neurones corticaux projetant à l'hypothalamus latéral.

3.2.4 Rôle du PFC dans la régulation du stress

L'activité du PFC semble particulièrement liée au stress puisqu'on retrouve le marqueur d'activité neuronale c-Fos suite à certaines procédures de stress telles que la contention, la défaite sociale ou les chocs électriques (Ostrander et al., 2003 ; Numa et al., 2019 ; Holmes et Wellman, 2009). De plus, les neurones du PFC augmentent leur taux de décharge suite à une exposition aiguë à des facteurs de stress tels que des pincements de la queue (Del Arco et al., 2020). Le PFC joue également un rôle dans la modulation des processus émotionnels tels que l'extinction conditionnée de la peur et la contrôlabilité des facteurs de stress (Amat et al., 2005). En effet, l'inactivation du PFC, par injection de muscimol, empêche les animaux de distinguer des conditions de stress contrôlable ou incontrôlable. Autrement dit, les rats en condition de stress contrôlable présentent le même comportement que les rats en condition de stress incontrôlable (Amat et al., 2005). En outre, une sous-population d'interneurones exprimant le CRH dans le PFC a été identifiée comme jouant un rôle clé dans la sélection de stratégies comportementales face à différentes situations stressantes (Chen et al., 2020). En effet, l'ablation sélective de ces interneurones, ou leur inhibition chémogénétique, induit une diminution du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevée (EPM, *elevated-plus-maze*), un évitement social et une augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée. À l'inverse, l'activation chémogénétique de ces interneurones induit une augmentation du temps passé dans bras ouverts, une diminution de l'immobilité à la fois dans le test par suspension de la queue et dans le test de la nage forcée. En cohérence avec ces résultats, des lésions des parties PL et IL du PFC induisent une immobilité accrue lors du test de la nage forcée (Chang et al., 2014).

En résumé à propos du PFC :

- Le PFC possède une position anatomique idéale pour intégrer différentes informations de l'environnement (interne et externe à l'individu) afin de détecter une situation stressante.

- Des manipulations (activation/inhibition) du PFC ont un effet sur la régulation du sommeil qui dépend des voies de projections impliquées. À titre d'exemple, nous avons vu que les projections PFC-LH induisent le sommeil paradoxal.
- Grâce à ses nombreuses projections sous-corticales, le PFC serait capable de moduler l'activité de diverses autres régions, et en particulier, le VLPO qui est un important centre du sommeil.

En conclusion, le PFC est une structure de haut niveau capable d'intégrer un grand nombre d'informations liées à la fois à l'environnement externe dans lequel se trouve l'individu, mais également à l'état interne de celui-ci. En plus des nombreuses afférences qu'il reçoit, le PFC projette massivement vers un grand ensemble de structures sous-corticales dont il peut ainsi moduler l'activité en adéquation avec une situation perçue comme dangereuse afin de fournir une réponse adaptée. Parmi les structures cibles en aval du PFC, on retrouve le VLPO qui est la structure historiquement associée au sommeil. Cette voie anatomique n'a encore été que très peu étudiée et pourrait constituer un candidat idéal pouvant être à l'origine des changements dans l'architecture du sommeil associés au stress.

Résultats

Chapitre 4 : Publication scientifique (*soumise*)(en anglais) : A top down control for stress-induced REM sleep fragmentation

Comme je l'ai présenté en introduction, la littérature concernant les effets du stress sur le sommeil est abondante, mais ne fournit pas de consensus. En effet, nous avons vu que les modifications induites par le stress peuvent être très variables, parfois opposées, selon le type de stress utilisé. Il s'agit d'un enjeu d'autant plus important que le stress est associé à de nombreuses maladies psychiatriques comme les troubles de stress post-traumatiques, la dépression ou encore les troubles anxieux ; dans lesquelles des altérations du sommeil sont souvent rapportées. Dans certains cas, les modifications du sommeil observées peuvent servir d'indicateurs au développement de la maladie, comme c'est le cas pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal qui peut permettre de « prédire » le développement d'un trouble de stress post-traumatique (Mellman et al., 2002). Il est donc nécessaire de préciser comment le stress affecte le sommeil et surtout de disséquer les potentiels candidats capables de médier ces effets.

Pour répondre de manière adaptée à une menace, l'organisme a besoin d'une structure cérébrale qui puisse intégrer des informations liées à l'environnement (suis-je en présence de prédateurs ?) mais aussi liées à l'état interne de l'individu (suis-je prêt à m'enfuir ?). Aussi, cette structure doit être capable de moduler l'activité d'autres structures cérébrales afin d'orchestrer une réponse adaptée. Dans l'introduction, nous avons vu que le PFC répond à l'ensemble de ces critères. De plus, on sait que le PFC projette au VLPO qui est un acteur majeur de la régulation du sommeil. Ensemble, ces deux structures forment donc une voie anatomique susceptible de pouvoir moduler l'architecture du sommeil. L'objectif de cette publication a donc été de déterminer si cette voie intervient dans la régulation du sommeil en condition de stress ; et permettrait également d'affiner la littérature naissante sur l'implication d'un contrôle cortical descendant sur des structures du sommeil.

Pour ce faire, nous avons eu recours à des techniques d'électrophysiologie (*ex vivo* et *in vivo*) associées à des techniques de manipulation de l'activité neuronale (optogénétique et chémogénétique). Nous avons choisi d'utiliser un protocole de stress par défaite sociale, car il s'agit d'un stress écologiquement pertinent pour les souris, qui mime donc bien les conflits sociaux fréquemment rapportés chez l'homme dans le cadre de troubles d'anxiété ou de

dépression mentionnés précédemment.

Nous avons montré que les souris ayant subi un stress par défaite sociale présentaient une phase initiale d'insomnie, souvent rapportée dans la littérature ; suivie d'une phase tardive de fragmentation du sommeil paradoxal n'ayant, à notre connaissance, encore jamais été rapportée. Nous avons ensuite réalisé des expériences d'inhibition chémogénétique du PFC de manière large ainsi qu'une inhibition plus spécifique des neurones du PFC qui projettent au VLPO afin de tester leur implication. L'inhibition chémogénétique large du PFC et de la voie PFC-VLPO n'ont induit aucune modification du sommeil en condition basale (sans stress). En revanche, suite à la procédure de stress par défaite sociale, l'inhibition large du PFC induit une diminution du pourcentage de sommeil paradoxal ; tandis que l'inhibition plus spécifique de la voie PFC-VLPO abolit la fragmentation du sommeil paradoxal initialement observée après le stress. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le PFC, et plus précisément, la voie PFC-VLPO est spécifiquement recrutée en condition de stress et semble impliquée dans la mise en place de la fragmentation du sommeil paradoxal induite par le stress. En outre, la discordance entre les effets de l'inhibition large du PFC et de la voie PFC-VLPO suggère que différentes voies anatomiques issues du PFC pourraient avoir des effets divergents selon les structures cibles en aval.

Afin de confirmer si la voie PFC-VLPO est suffisante pour induire la fragmentation du sommeil paradoxal observée, nous avons réalisé des manipulations optogénétiques de la voie PFC-VLPO pendant le sommeil. Nous avons montré que l'activation de cette voie pendant le sommeil paradoxal (et en l'absence de stress) induit une diminution de la durée des épisodes de sommeil paradoxal en interrompant l'épisode en cours au profit du sommeil lent. Ces résultats confirment le rôle de la voie PFC-VLPO dans la fragmentation du sommeil paradoxal induite par le stress ; et corroborent le rôle du VLPO, classiquement décrit dans la littérature, dans la promotion du sommeil lent.

Dans la dernière partie, nous avons réalisé des manipulations optogénétiques *ex vivo* de la voie PFC-VLPO. Nous avons ainsi démontré que le VLPO reçoit des projections directes du PFC et qu'une majorité de ces neurones répondent par des courants post-synaptiques excitateurs aux stimulations optogénétiques des afférences corticales, confirmant l'influence glutamatergique du cortex. De plus, nous montrons que ces projections excitatrices ciblent exclusivement les neurones promoteurs de sommeil du VLPO, identifiés par leurs propriétés intrinsèques, observables *ex vivo*. Ainsi, ces résultats sont en accord avec nos précédentes expériences *in vivo*.

A top-down control for stress-induced REM sleep fragmentation

Authors:

Chouvaeff M.[1], Descamps A.[1], Bagur S.[1], Mace L.[1], Benchenane K[1,*,&], Gallopin T.[1,*,&].

Affiliations:

(1) Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-Paris, PSL Research University, Paris, France.

[&] These authors contributed equally to this work

* corresponding authors

Acknowledgments:

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and ESPCI-Paris.

The authors declare that no competing interests exist.

Author contributions: T.G., K.B. conceived and designed the study; M.C., L.M., A.D., T.G. collected data. M.C., T.G. analyzed data; M.C., and T.G. created the visualization; M.C, T.G. drafted the article. M.C., S.B., T.G. and K.B. revised the article. T.G. and K.B supervised the study; and K.B. acquired the funding.

ABSTRACT

The cerebral structures orchestrating the daily cycles of wake, REM and NREM sleep have been identified in remarkable detail. However, the mechanisms by which they dynamically adapt to environmental challenges remain to be fully understood. Here, we show that the prefrontal cortex (PFC), a key hub in stress regulation, modulates the sleep architecture through direct projections to the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO), a major sleep center. We characterize the detailed sleep architecture in mice after social defeat stress (SDS) and discover, for the first time, a long-lasting fragmentation of REM sleep. Chemogenetic inhibition of PFC to VLPO projections has no effect under normal conditions but prevents SDS-induced REM sleep fragmentation. Interestingly, optogenetic activation of this pathway is sufficient to mimic REM sleep fragmentation, despite the absence of the stressor, by interrupting REM sleep in favor of NREM sleep. Finally, using *ex vivo* optogenetics, we demonstrate that activation of PFC terminals induces monosynaptic currents in VLPO sleep-promoting neurons. Therefore, the PFC-VLPO pathway provides a top-down regulation specifically recruited under stress to induce short, fragmented REM sleep episodes and favors NREM sleep. This suggests a strategic adaptation during stress to mitigate the vulnerabilities associated with prolonged REM sleep.

INTRODUCTION

On a daily basis, mammals alternate between wakefulness and two sleep states: non-rapid eye movement (NREM) sleep and rapid eye movement (REM) sleep. These states can be identified by specific oscillatory patterns on the electroencephalogram (EEG). Wakefulness is characterized by a high-frequency and low-amplitude activity as well as high electromyography (EMG) activity. In contrast, NREM sleep exhibits low-frequency and high-amplitude EEG patterns. REM sleep displays EEG characteristics similar to wakefulness, with prominent theta oscillations (6–9 Hz) in the hippocampus (HPC), together with a significantly reduced EMG tone, reflecting muscle atonia[1,2].

Many studies have identified the neural circuits underlying each sleep state but their regulation can be influenced by a large variety of factors such as circadian rhythm, homeostasis, temperature, or metabolic regulation[3–5]. Notably, the level of stress constitutes a strong sleep disruptor. Indeed, species facing a high risk of predation, such as mice, display less sleep, in particular REM sleep, compared to predators[6]. Moreover, sleep perturbations are a prominent feature of psychiatric disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD), depression or generalized anxiety[7,8]. Additionally, stress-induced sleep modifications exhibit substantial variability depending on the characteristics of the stressor such as its type, duration, intensity or controllability/predictability[8–11]. This variability can lead to a large spectrum of sleep modifications, sometimes even eliciting opposite effects. For instance, the commonly used immobilization stress induces an increase in REM sleep percentage when the exposure is brief whereas a longer exposure to the stressor induces a decrease in REM sleep[8]. The complex relationship between sleep and stress can lead to severe health problems, which underscores the importance of identifying the neural circuits that mediate stress-induced sleep modifications to better understand their contributions to sleep architecture.

Whereas the basal regulators of sleep states are found in the brainstem and hypothalamus, it is likely that the flexible and contextual adaptations associated with stress will rely on top-down inputs from higher-level structures, capable of integrating cues from the environment and the animal's state. The prefrontal cortex (PFC), particularly its infralimbic region (IL), is ideally positioned to mediate between stress and sleep. With its extensive connections to limbic regions, the PFC plays a major role in

68 modulating emotional behaviors[12,13]. Indeed, when facing different stressful situations, the
69 PFC plays a role in the selection of the coping strategy to deal with the stressor[14].
70 Furthermore, the PFC projects to the ventrolateral preoptic nucleus[15,16] (VLPO), which is
71 associated with sleep regulation, particularly with NREM sleep initiation and
72 maintenance[17–24]. Studies also indicate a role for the VLPO in REM sleep regulation[20,25–27].
73 Altogether, these evidences suggest that the VLPO-projecting PFC neurons could
74 mediate the effects of stress on sleep. To date, how cortical projections modify the
75 activity of sleep-promoting structures remains unclear and only a few causal links have
76 been established[28]. Therefore, we tested the hypothesis that the PFC directly modulates
77 sleep-promoting neurons of the VLPO and participates in the stress-induced sleep
78 modifications. A c-Fos activity has been reported in the IL and prelimbic (PL) parts of the
79 PFC following social defeat stress[29]; therefore, we chose to assess sleep architecture after
80 this procedure, associated with a specific manipulation of the PFC-VLPO pathway using
81 inhibitory DREADD receptors expression. We show that the social defeat stress (SDS)
82 induces a long-lasting REM sleep fragmentation, which is rescued when
83 chemogenetically inhibiting the PFC-VLPO pathway. Subsequently, using both *in vivo*
84 and *ex vivo* optogenetic approaches, we show that the PFC sends direct inputs to the
85 VLPO and that activating this pathway shortens REM sleep by promoting transition to
86 NREM sleep.

RESULTS

Social defeat stress induces a long-lasting REM sleep fragmentation

Studies between REM sleep and stress have yielded conflicting results. To investigate the impact of acute stress on REM sleep macrostructure, we have performed a social defeat stress protocol.

In our experimental setup, mice were implanted with intracerebral electrodes to record local field potentials (LFP) simultaneously in the olfactory bulb (OB) and the hippocampus (HPC). Subsequently, mice were submitted to the social defeat stress (SDS) protocol adapted from Henderson et al., 2017, which is the first study reporting the acute effect of SDS on sleep in mice. Briefly, the protocol involves a 5 minute physical interaction with a larger, more aggressive CD-1 mouse, followed by a 20 minute period without physical contact but with sensory interaction through a transparent and perforated partition (**Fig. 1A**). This sensory interaction phase was conducted first in the aggressor's cage and then repeated in the experimental mouse's home cage to reinforce the stressor-sleep context association. Finally, the CD-1 mouse was removed, and the experimental mouse's sleep was recorded for the rest of the day.

To validate the social defeat stress (SDS) protocol, we verified that it increased stress levels using the standard elevated-plus-maze (EPM). Subgroups of mice were exposed to the EPM test, either right after the SDS protocol or in a control condition. As expected, SDS mice displayed a strong avoidance of the open arms of the EPM, as illustrated by the trajectories shown in **Figure 1B** (control in black, SDS in orange) and evidenced by the quantification of the percentage of time spent in the open arms (**Fig. 1C**).

Then we assessed the sleep-wake architecture of mice after they had experienced SDS. To ensure that all mice began their sleep session at the same time, control mice were plugged to the recording cable at the same time as for the SDS protocol. Examining the sleep states of mice after SDS, we identified three distinct phases in the sleep-wake architecture. During the first phase (1 to 2 hours post SDS), the SDS led to a strong insomnia characterized by a significant increase in the percentage of wakefulness at the expense of both NREM and REM sleep (**Fig. 1D-F**). The decrease in REM sleep during this phase was due to the overall lack of sleep. Over the next two hours (3 to 4 hours post SDS), NREM sleep percentage in SDS mice progressively returned to control mice levels

(**Fig. 1E**), while REM sleep percentage remained significantly lower, highlighting a selective decrease in REM sleep (**Fig. 1F**). During the third and final phase (5 to 8 hours post SDS) neither NREM nor REM sleep quantity differed in SDS mice compared to control mice (**Fig. 1E-F**), suggesting that SDS mice had recovered normal sleep. However, a more detailed analysis revealed that REM sleep in SDS mice was more fragmented. This is evidenced by a significant decrease in the duration of REM sleep bouts in SDS mice (**Fig. 1H**) without any significant difference in the number of REM sleep bouts between SDS and control mice (**Fig. 1G**).

Overall, these results indicate that the SDS induced an initial state of insomnia consistent with previous results[35]. Then, we identified a phase of decreased REM sleep bouts duration without any global change in sleep states quantity that persisted up to 8 hours post SDS. These results highlight a novel long-lasting effect of stress on REM sleep fragmentation.

Given these findings, in the rest of the manuscript, we focus on two clearly defined periods: the first phase of insomnia (1-2h, "early phase") and the final phase of specific REM fragmentation (5-8h, "late phase") since phase 2 is essentially an intermediate period during which NREM and REM quantity were transitioning back to control levels (**Fig. 1I**).

The PFC-VLPO pathway mediates the REM sleep fragmentation induced by the social defeat stress

Previous studies reported a cFos activity in the IL/PL parts of the PFC in mice submitted to the social defeat stress[29], which is consistent with our hypothesis that cortical neurons could modulate sleep centers, in particular the VLPO, to mediate the stress-induced sleep modifications.

To examine the necessity of the VLPO-projecting PFC (IL/PL) neurons in inducing stress-related sleep modifications, we sought to inhibit this pathway specifically following SDS. Mice were injected with rAAV2-hSyn-EGFP-Cre in the VLPO, associated with AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry injection in the PFC (**Fig. 2A**). Such a construct enables one to selectively target the PFC to VLPO projecting neurons and inhibit their activity chemo-genetically under the control of CNO. We identified a significant population of GFP-labeled neurons within the IL/PL regions of the PFC (**Fig. 2D**), confirming previous evidence for the existence of the monosynaptic PFC-VLPO anatomical pathway in mice.

With confocal microscopy, we verified that the DREADD hM4Di receptors, labeled by mCherry fluorescence, were specifically expressed in GFP-labeled neurons (**Fig. 2E**). This colocalization demonstrates that our *in vivo* chemogenetic experiments specifically targeted the PFC neurons that project to the VLPO.

To confirm that the DREADD hM4Di receptors were functional, we performed patch clamp experiments to examine the effect of CNO on the membrane potential of PFC neurons identified by mCherry fluorescence *ex vivo* in slices (**Fig. S1**). Bath application of CNO (10 µM) systemically induced a hyperpolarization in all the mCherry expressing cells recorded (n=4/4, **Fig. S1**).

The same viral strategy was then applied in mice that were implanted with intracerebral electrodes to record sleep. Mice underwent the SDS protocol and subsequently received an injection of either saline, as a control, or CNO (2.5mg/kg) before the beginning of the sleep session (**Fig. 2B**). In total we assessed the sleep-wake architecture in 4 groups of mice: *(1) non-stressed mice receiving saline injection as a control*, *(2) SDS+mCherry+saline (control for injection)*, *(3) SDS+mCherry+CNO (control for the effect of CNO alone) and* (4) *SDS+hM4Di+CNO (inhibition of the PFC-VLPO pathway)*.

We first assessed the global sleep-wake architecture on hypnograms of individual mice (**Fig 2F**). Consistent with observations in Figure 1, during the early phase, we observed prolonged period of wakefulness in the three groups submitted to the social defeat stress (SDS+mCherry+saline, SDS+mCherry+CNO, SDS+dreadd+CNO) compared to control non-stressed mice. Then, during the late phase, we could clearly identify numerous short REM sleep bouts in both control groups submitted to SDS (SDS+mCherry+saline and SDS+mCherry+CNO) compared to control non-stressed mice (**Fig. 2F**). Strikingly, these short REM sleep bouts were no longer observed after inhibition of the PFC-VLPO pathway (SDS+dreadd+CNO group). In order to confirm these observations, we computed quantifications across the early and late phases of the sleep session (**Fig. 2G-P**). Both control groups submitted to SDS (SDS+mCherry+saline and SDS+mCherry+CNO) showed the initial phase of insomnia and the final phase of specific REM fragmentation relative to unstressed controls (**Fig. 2G, 2P**). In mice in which the PFC-VLPO pathway was inhibited with chemogenetics (SDS+dreadd+CNO), no effect was observed on early insomnia (**Fig. 2L-N)** but we observed a clear restoration of REM fragmentation as evidenced by the equal REM sleep bouts duration relative to the control non-stressed mice (**Fig. 2P)**. We therefore deduced that REM sleep fragmentation following SDS could

be specifically rescued by PFC-VLPO inhibition, indicating that this pathway may be necessary for the SDS-induced long term sleep modifications.

Importantly, the inhibition of the PFC-VLPO pathway under basal sleep conditions (i.e without stressor) had no effect on sleep macrostructure (**Fig. S2C-G**). Likewise, a broader chemogenetic inhibition of the whole PFC did not modify sleep architecture under basal conditions (**Fig. S3C-G**). However, following SDS, this broad PFC inhibition led to a decrease in REM sleep percentage during the late phase of the sleep session (**Fig. S3**). These results suggest that broad PFC activity promotes REM sleep, which is consistent with a previous study[28], but that the more specific PFC-VLPO pathway we are studying here inhibits REM sleep. This highlights the divergent influence of the diverse PFC projections on sleep architecture.

Altogether these results show that specific inhibition of the PFC-VLPO pathway rescues the late-phase REM sleep fragmentation induced by SDS exposure. This demonstrates a key role for the PFC-VLPO circuit in stress-induced sleep modifications, suggesting that this pathway is selectively recruited under these stressful situations.

Increased occurrence of short REM sleep bouts drives SDS-induced REM sleep fragmentation

Having established that SDS induces REM sleep fragmentation requiring an intact PFC-VLPO pathway, we more closely investigated the temporal structure of REM sleep. When analyzing the mean duration of REM sleep bouts based on their lengths, we found that beyond 25 seconds, there was no longer a difference between the control groups exposed to SDS (SDS+mCherry+sal and SDS+mCherry+CNO), the non-stressed group and the rescued group (SDS+dreadd+CNO) (**Fig 3B**). We therefore consider 25 seconds as the threshold to distinguish between short and long REM sleep bouts in this study. During the late phase of post-SDS sleep, we found that the shift to shorter average REM sleep bouts in SDS mice was entirely driven by short bouts (<25s). Indeed, excluding these bouts from the analysis completely abolished the effect of SDS on REM sleep structure in the late phase (**Fig. 3B-C**). Accordingly, we observed an increased occurrence of these short bouts in both control groups submitted to social defeat that was either significant (SDS+mCherry+saline) or showed a tendency (SDS+mCherry+CNO) (**Fig. 3D**). In other words, REM sleep in stressed mice is constituted of a larger proportion of short bouts.

Interestingly, the chemogenetic inhibition of the PFC-VLPO pathway (SDS+mCherry+CNO group) shifted the profile of REM sleep bouts duration back to that observed in non-stressed animals (**Fig. 3B-C**). These results refine the mechanism by which REM sleep fragmentation occurs after SDS, indicating a specific increase in short (<25s) REM sleep bouts. They also highlight an important methodological point, stating that including these short REM sleep bouts is essential to be able to detect late REM sleep fragmentation and assess the functional impact of the PFC-VLPO pathway. Therefore, we wanted to verify whether these short bouts classified as REM sleep were accurately identified and whether these short bouts had any distinguishing characteristics. We therefore compared the electrophysiological characteristics of hippocampal LFP signals between short and typical REM sleep bouts. In order to restrict our analysis to the extreme REM sleep bout values, we focused on short bouts of less than 10 s and contrasted these with all other bouts. We observed that both types exhibited prominent theta oscillations with similar theta power and frequency (**Fig. 3E-F**). Additionally, electromyogram (EMG) recordings revealed uniformly low muscle activity across both episode types (**Fig. 3G-H**). These electrophysiological signatures differed from those observed during NREM sleep (**Fig. 3G-H**) and wakefulness (data not shown). Consequently, the primary distinction between these short REM sleep bouts and typical ones lies in their duration, highlighting the important role of temporally precise sleep scoring when studying stressful situations that can lead to fragmented sleep.

The optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway is sufficient to induce the REM sleep fragmentation

We then wanted to investigate whether activation of the PFC-VLPO pathway was sufficient to induce the REM sleep fragmentation previously observed. Mice were injected in the IL/PL parts of the PFC with an AAV9-CamK2-ChR2-mCherry (ChR2 mice, n=5) or an AAV9-CamK2-mCherry as a control (mCherry mice, n=5) (**Fig S4A-B**). All animals were implanted with intracerebral electrodes like previously described to perform sleep scoring. Bilateral optical fibers were implanted in the VLPO (**Fig. 4A**) to specifically activate VLPO-projecting PFC terminals through 30 s light trains at 20 Hz, delivered during both in NREM and REM sleep. In order to identify the effect of the PFC-

VLPO pathway activation on both sleep states, we analyzed separately stimulations delivered on sustained (>5 s) NREM and REM sleep episodes.

Activation of VLPO-projecting PFC neurons during REM sleep led to a fast and significant decrease in the REM sleep percentage in ChR2 mice compared to mCherry mice (**Fig. 4F**), as quantified over the 30s stimulation period. This decrease in REM sleep percentage was characterized by a sharp decrease in the theta band on the hippocampal spectrogram as seen for a ChR2 mouse, whereas no change was observed for a mCherry mouse (**Fig. 4B**). Consistent with this observation, a significant decrease in theta/delta power, averaged in the 30 s stimulations window, was observed in ChR2 mice compared to mCherry mice (**Fig. 4C**). Moreover, the decrease in REM sleep percentage induced by stimulations was mirrored by a significant increase in NREM sleep percentage in ChR2 mice compared to mCherry mice (**Fig. 4E**). No change was observed in wakefulness percentage, indicating that the optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway did not awaken mice (**Fig. 4D**). Accordingly, we observed an increase in hippocampal sharp-wave ripples occurrence, an electrophysiological marker of NREM sleep, in ChR2 mice compared to mCherry mice during REM sleep stimulations (**Fig. 4G-H**). In addition, we demonstrate that photoactivation of cortical terminals in the VLPO significantly increases the probability of transitioning from REM to NREM sleep rather than wakefulness (**Fig S4C-D**). Overall, this reinforces the notion that activation of the PFC-VLPO pathway promotes the transition from REM to NREM sleep, which is consistent with the established NREM sleep-promoting role of the VLPO.

We then analyzed the REM sleep architecture in more detail over the whole sleep session. While the number of REM sleep bouts remained unchanged, we found a significant decrease in the mean duration of REM sleep bouts in ChR2 mice compared to mCherry mice (**Fig. 4G**). This is consistent with the observation that the stimulations delivered during REM sleep suppressed the ongoing episode.

Contrary to REM sleep, when delivered during NREM sleep, stimulations did not induce any significant change in the quantity of sleep or wake states between ChR2 and mCherry mice (**Fig. S5**). In addition, no change in the power band of slow oscillations (1-4 Hz) was observed in the PFC spectrogram around stimulations time (**Fig. S5**). These results support a selective role for the PFC-VLPO pathway during REM sleep.

Altogether, these findings indicate that the activation of the PFC-VLPO pathway is sufficient to induce the REM sleep fragmentation by promoting the transition toward

NREM sleep. This alteration in the maintenance of REM sleep likely accounts for the REM sleep fragmentation we observed during the late phase SDS.

PFC sends excitatory and inhibitory monosynaptic projections to VLPO neurons

To investigate the functionality of the connectivity between PFC and VLPO neurons, we conducted patch-clamp recordings on 57 VLPO neurons in brain slices from mice that had been previously injected in the PFC with an AAV9-CamK2-ChR2-mCherry (**Fig. 5A**). We thus examine the effects of photostimulations of axonal fibers originating from the PFC (**Fig. 5B-C**). The intracellular recording solution was deliberately depleted of chloride ions to set the chloride equilibrium potential (ECl) near -90mV, thereby facilitating the distinction between GABAergic and glutamatergic currents during recordings held at a voltage-clamp mode of -60 mV. Upon optogenetic activation, 40 of the 57 neurons sampled responded, with the remainder exhibiting no perceptible response to stimulation. The large majority of these responsive neurons (26 out of 40, or 65%, **Fig. 5D**) exhibited excitatory postsynaptic currents (EPSCs), identifiable in Figure 5E. Conversely, a minority subset (14 out of 40, or 35%, **Fig 5D**) demonstrated inhibitory responses, characterized by inhibitory postsynaptic currents (IPSCs), as illustrated in Figure 5J.

Neurons excited by photostimulation of the PFC terminals exhibited EPSCs with a mean amplitude of 33.4 ± 6.2 pA and a mean latency of 3.3 ± 0.19 ms. The abolition of these photo-evoked EPSCs following the administration of the glutamatergic receptor antagonist kynurenate (1 mM, **Fig. 5F**) unambiguously confirmed the glutamatergic nature of the excitatory inputs to these VLPO neurons. Additionally, the persistence of photo-evoked EPSCs in the presence of tetrodotoxin (TTX, 1 µM) and 4-aminopyridine (4-AP, 100 µM), (**Fig. 5E**) (n=2/2), clearly evidenced that excitatory connections from PFC neurons to VLPO neurons were monosynaptic. Further analysis in current-clamp mode revealed that these neurons typically displayed low-threshold spikes (LTS, observed in 21 out of 26 neurons, **Fig. 5H**) and were hyperpolarized by noradrenaline (-6.3 ± 1.8 mV, in 4 out of 5 neurons tested, **Fig. 5I**). These two combined features (presence of a LTS and the NA-induced inhibition) are typically associated with the properties of VLPO sleep-promoting neurons (**Fig. 5G**).

In contrast, the 35% minority of neurons that responded with IPSCs to PFC photostimulations showed an average amplitude of -37 ± 10.3 pA and a latency of 2.9 ±

0.14 ms. Notably, the persistence of these currents in the presence of TTX/4-AP (n=3/3, **Fig. 5J**) indicated that they originate from direct monosynaptic inhibitory inputs from PFC neurons to the VLPO. Furthermore, this inhibition was identified as GABAergic following the complete suppression of these IPSCs by the $GABA_A$ receptor antagonist, bicuculline (20 µM, n=5/5, **Fig. 5K**), revealing a GABAergic projection from the PFC onto a particular subset of VLPO neurons. Remarkably, these neurons were predominantly characterized by the absence of LTS (57%, **Fig. 5M)** and consistently depolarized by noradrenaline (4.8 ± 0.43 mV, in 5 out of 6 neurons, **Fig. 5N**), distinguishing them from the majority of VLPO neurons excited by PFC projections (**Fig. 5E-I**).

Overall, these results show that excitatory and inhibitory projections from the PFC to the VLPO target largely opposing populations composed of classical sleep-promoting and non-classical neurons respectively. Such findings highlight the intricate and nuanced nature of the PFC's modulatory impact on the VLPO, underscoring the existence of differential modulation based on the intrinsic properties of the target neurons.

DISCUSSION

A major challenge in sleep research is to understand the mechanisms by which stress modifies and adapts the fine regulation of the different sleep states. Our study demonstrates that acute social defeat stress (SDS) induces a strong insomnia followed by a long-lasting REM sleep fragmentation. We identified a specific neuronal pathway involving the prefrontal cortex (PFC) that influences the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) through direct synaptic connections. This pathway is selectively recruited under stressful conditions to mediate REM sleep modifications. Indeed, using chemogenetic techniques, we showed that inhibition of the PFC-VLPO pathway restores normal REM sleep, highlighting its necessity for the stress-induced REM sleep fragmentation. However, this pathway did not affect the early insomnia induced by stress. Complementing these findings, optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway was sufficient to mimic REM sleep fragmentation in the absence of stress, predominantly facilitating transitions into NREM sleep. Additionally, we show that ex vivo optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway monosynaptically excites VLPO neurons with sleep-promoting properties, such as low-threshold spikes and noradrenaline-induced inhibition, which supports the previously established role of the VLPO in facilitating NREM sleep.

In our study, we observed significant REM sleep fragmentation during the later phase of the sleep session in mice submitted to SDS, even though the total amount of REM sleep had returned to baseline. This fragmentation was characterized by an increase in short REM episodes lasting less than 25 seconds. This emphasizes the importance of meticulously identifying brief REM periods, which may be underestimated depending on the sleep scoring method used. Detailed analysis of REM sleep structure, including the number and mean duration of REM sleep episodes, is crucial for understanding the complex impacts of stress on sleep architecture[37–39]. To our knowledge, prolonged REM sleep fragmentation following SDS has not been previously reported. In human studies, REM sleep fragmentation has been linked to stress-related conditions such as PTSD development[40]. Only a few studies have identified such processes in rats, observing some REM sleep fragmentation after fear conditioning[41]. Altogether, this suggests that REM

363 sleep fragmentation should be carefully monitored in sleep studies, especially in stressful
364 situations, even when the total amount of REM sleep appears to be normal.
365
366 We showed that the stress-induced REM sleep fragmentation is fully reversed by the
367 PFC-VLPO pathway inhibition, suggesting a key role of the PFC in the sleep modifications
368 after stress. The PFC enables organisms to adapt to stress[12] and plays an important role
369 in sleep regulation[42]. Studies have shown that PFC lesions induce sleep fragmentation and
370 increase REM sleep[43], suggesting an inhibitory role of the PFC on REM sleep, which aligns
371 with our findings. However, a recent study showed that optogenetic activation of the PFC
372 promotes REM sleep[28], which, at first sight, seems to contradict our findings. To address
373 this disparity, we must consider a key finding of our study: the differential regulatory
374 mechanisms under basal versus stressful conditions. Indeed, we found that
375 chemogenetic inhibition of a large portion of the PFC had no effect on the overall sleep-
376 wake architecture under unstressed conditions but decreased the REM sleep percentage
377 following the SDS protocol. Our results with global PFC inhibition in stressed mice
378 therefore align with those of Hong et al[28]. Considering the varying role of the PFC based
379 on stress levels and the challenges of controlling environmental conditions (e.g., animal
380 housing, experimenter[44]), different laboratories' mouse cohorts may experience varying
381 stress levels. This variability can lead to contradictory results when studying so-called
382 baseline sleep.

383 Additionally, Hong et al. indicated that increased REM sleep was driven by optogenetic
384 activation of PFC projections to the lateral hypothalamus (LH)[28]. In contrast, we observed
385 that the optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway suppresses REM sleep
386 episodes. Overall, this indicates that the PFC can have different effects on REM sleep
387 depending on the targeted pathway and the stress level of the animal. Furthermore, we
388 found that the rescue of the stress-induced REM sleep fragmentation by chemogenetic
389 inhibition of the PFC-VLPO pathway occurred only under stressful conditions. This
390 suggests that top-down cortical projections to the VLPO are specifically recruited in
391 response to stress. These results highlight the need to carefully consider the stress level
392 in sleep studies and underscore the specialized influence of specific PFC neuronal
393 projections to different subcortical structures in regulating sleep under various
394 conditions.

To directly investigate the mechanistic role of this pathway, we evaluated the effect of optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway on sleep architecture. Interestingly, we found that activating this pathway was sufficient to mimic REM sleep fragmentation without stress. This led to a decrease in REM sleep and an increase in NREM sleep, which is consistent with the VLPO's role in promoting NREM sleep[45,46]. This was further supported by the increased density of sharp wave–ripples following stimulations during REM episodes. Our ex vivo experiments characterized the neurons responding to the optogenetic activation, showing that the VLPO receives monosynaptic projections from the PFC, confirming previous anatomical evidence[15,16]. Approximately two-thirds of the recorded VLPO neurons responded monosynaptically to PFC optogenetic stimulation with glutamatergic excitatory postsynaptic currents. These responsive neurons displayed a LTS and were inhibited by noradrenaline, typical properties of NREM-active neurons[30–34], and are likely galaninergic[31,32]. A mechanistic interpretation of the SDS-induced REM sleep fragmentation might be that some of these neurons would be activated by the PFC-VLPO pathway, facilitating transition from REM to NREM sleep and therefore resulting in shortened REM sleep episodes. This aligns with a study showing that chemogenetic activation of VLPO galaninergic neurons increases NREM sleep and suppresses REM sleep[24]. VLPO sleep-promoting neurons inhibit wake-active structures during NREM sleep[45]. Therefore, these neurons could also inhibit REM active structures to interrupt or prevent REM episodes. Indeed, VLPO sleep-active neurons project to the LH region containing melanin-concentrating hormone (MCH) neurons active during REM sleep[47], which project to ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG)[48]. These MCH neurons would initiate REM sleep through inhibitory projections onto vlPAG REM-off neurons. We thus hypothesize that photo-stimulations of cortical afferents activate GABAergic neurons in the VLPO, inhibiting MCH neurons and lifting the inhibition on REM-off neurons in the vlPAG, thereby terminating REM episode[5,49–52]. Another non-exclusive mechanism would involve the smaller proportion of VLPO neurons receiving cortical inhibitory inputs that we identified and which could correspond to REM-active neurons[21,53]. This could suggest that their inhibition contributes to the REM sleep fragmentation we observed. These cortical inhibitory inputs likely originate from long-range GABAergic neurons expressing somatostatin (SST)[54]. However, activation of this pathway does not primarily modify sleep architecture but induces nesting behavior, increases theta power and body temperature[54]. Moreover, only a minor fraction of the

VLPO neurons receiving inhibitory inputs from these GABAergic SST-expressing neurons express galanin[54], a marker of sleep-promoting neurons[46,55]. Our characterization of IPSC-responsive VLPO neurons, which lack classical sleep-promoting properties like LTS and noradrenaline inhibition, further supports this hypothesis.

Our results, combined with existing literature, demonstrate the complexity of stress effects on sleep. The specificities of stress protocols can affect not only the quantity but also the quality of sleep, including REM sleep integrity. Some studies report increased sleep immediately after SDS, potentially serving restorative functions[11,56,57]. These effects contrast with the classical view that stress induced insomnia[9] which is what our current findings, together with the study from Henderson et al., have observed. The heterogeneous responses might be due to the time of the day and intensity of SDS protocols. Insomnia was observed when SDS was applied at the onset of the light period, while increased sleep was reported when SDS started at the end of the light period or the beginning of the dark period[11,56,57]. Additionally, more intense SDS protocols, involving repeated physical interactions, reported increased sleep quantity[11,56]. It is also conceivable that sleep serves a restorative function after SDS, even when followed by insomnia. Indeed, a rebound in both NREM and REM sleep has been observed during the following nocturnal active phase[35,58], after SDS-induced insomnia. This suggests heightened sleep pressure and the activation of compensatory mechanisms to counterbalance the stress experienced.

Our results raise the question of the physiological role of the REM sleep fragmentation. Stressful conditions, such as a high predation risk, significantly alter sleep architecture, causing prey species to experience less sleep, especially less REM sleep, compared to predators[6]. REM sleep has the highest arousal threshold, making it a particularly vulnerable state for prey species[59–62]. Thus, REM sleep fragmentation induced by the PFC-VLPO pathway might protect the animal by reducing time spent in this vulnerable state. However, fragmenting REM sleep in a stressful environment rather than completely suppressing it, could be an advantageous strategy that would maintain a balance between monitoring the environment and the physiological need for sleep[63]. This strategy also preserves the total amount of REM sleep, suggesting REM sleep function may be compatible with splitting REM sleep episodes into shorter episodes, thus conserving the beneficial functions of this sleep phase.

In conclusion, our study demonstrates that the PFC regulates sleep states by activating VLPO sleep-promoting neurons, specifically recruited under stressful conditions, leading to fragmented REM sleep. This finding is consistent with the observation that REM sleep is the most vulnerable sleep state, suggesting that fragmentation may serve as a protective mechanism in stressful environments.

METHODS

Animals and housing

Male C57Bl/6J mice (6–15-week-old) and outbred male Swiss CD1 mice (9–16 week-old) were used in this study (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France). All behavioral experiments were conducted in accordance with the official European guidelines for the care and use of laboratory animals (86/609/EEC) and in accordance with the Policies of the French Ethics Committee. Experiments at the ESPCI were conducted in an animal facility that has been fully accredited by the French Direction of Veterinary Services (D75-05-14). An ethical committee and the Ministry of Research approved the animal experiments carried out in this study (APAFIS#24024202002101446908 6). We made every effort to limit the number of animals and their suffering as much as possible. The mice were housed at 22 ± 2 °C and on a 12 h light/dark cycle (08:00 - 20:00 light), with food and water available *ad libitum*.

Viral vectors

For the expression of the photo-sensitive cation channel Channelrhodopsin-2 (ChR2) in PFC neurons, an adeno-associated virus AAV9-pCaMKII-Chr2-mCherry (UNC Vector Core, USA) was injected in the Infralimbic (IL) / Prelimbic (PrL) cortex. Control mice were injected with a virus lacking the ChannelRhodopsin-2 sequence (AAV9-pCaMKII-mCherry, UNC Vector Core, USA). To achieve PFC-VLPO pathway specific inhibition, we combined Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) with the Cre/DIO system. We injected the adeno-associated viral vector AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (Viral Vector Facility, Zurich, Switzerland) in the PFC. The Cre-recombinase was retrogradely brought via an injection of the retro-adeno-associated viral vector rAAV2-hSyn-EGFP-Cre (Viral Vector Facility, Zurich, Switzerland) in the VLPO. As a control, mice received the same procedure, except the viral vector injected in the PFC was lacking the DREADD hM4Di sequence (AAV2-hSyn-DIO-mCherry, Viral Vector Facility, Zurich, Switzerland).

Stereotaxic viral injections

6-week-old mice were anesthetized in an induction chamber with 3 % isoflurane. Following anesthetic induction mice received analgesia (buprenorphine, 0,1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) injection) and were placed in a stereotaxic frame (David Kopf

Instruments, USA). Throughout the whole procedure, the isoflurane concentration was maintained at 1.5 - 2%. Core body temperature was maintained at 37°C with a heat pad. A local subcutaneous injection of lidocaine (4-5 mg/kg) was performed before the skin incision. Bilateral craniotomies were performed using a dremel above the structures of interest, IL/PrL (AP: +1.75, ML: ± 0.5, DV: - 2.1) and/or VLPO (AP: + 0.7, ML: ± 0.7, DV: - 5.1). A Hamilton syringe was lowered and maintained for 5 min before the beginning of viral injection (150 nL, 15 nL/min) and for an additional 5 min after injection to avoid vector reflux. The injection was performed using a programmable pump (LEGATO 130, KDScientific). The incision was sutured and disinfected. Mice received subcutaneous injection of Metacam (1m g/kg) and/or Buprenorphine (0.1 mg/kg) and recovered from surgery in individual cages on a heated mat for 24 h.

Slice preparation for electrophysiological recordings

For the recordings performed in the VLPO or in the PFC, mice aged 7 to 8 weeks were deeply anesthetized with ketamine (1%) and xylazine (1‰) and were perfused intracardially with an ice-cold sucrose solution containing (in mM): Sucrose (230), CaCl2 (0,5), glucose (10), KCl (2.5), MgSO4 (10), NaHCO3 (26); NaH2PO4 (1.25), kynurenate (3). The animals were decapitated, and brains were quickly removed in the same ice-cold solution. Coronal slices (250 µm thick) were cut with a vibratome (VT2000S; Leica), collected and maintained for 10 minutes in a chamber containing artificial Cerebro-Spinal Fluid (aCSF) warmed to 36°C containing (in mM): 130 NaCl; 5 KCl; 2.4 CaCl2; 20 NaHCO3; 1.25 KH2PO4; 1.3 MgSO4; 10 D-glucose; and 15 sucrose; kynurenate (1) (pH = 7.35). Slices were then transferred in another chamber containing the same previous aCSF solution without kynurenate and at room temperature. A recovery period of 60 minutes was then observed before slices were transferred to the recording chamber, where they were maintained immersed and continuously supervised at 1-2 ml/min with the same aCSF saturated with 95% oxygen and 5% carbon dioxide.

Whole cell Patch-Clamp recordings

Individual slices were submerged in a recording chamber, placed on the stage of an Axioskop 2FS microscope (Carl Zeiss), equipped with Dodt gradient contrast optics (Luigs & Neuman), and an infrared CCD camera (CoolSNAP HQ2; Roper Scientific, Germany). Neurons in the slices were visualized by using infra-red (IR) videomicroscopy. Pipettes (4 to 6 MΩ) were pulled from borosillicate capillaries (1,5 mm o.d., 0,86 mm i.d., Harvard

Appartus, France) and filled with 8 µl of autoclaved internal solution containing 144 mM K-gluconate, 1 mM MgCl2, 0.2 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.2 (285/295 mOsm) and were attached to a micromanipulator (Luigs er Neuman). Because the intracellular solution used was depleted in chloride, the equilibrium potential of this ion was: ECl ≈ -90mV. Thus, potential GABAergic currents appear outward at potentials more depolarized than ECl whereas cationic currents are inward. All electrophysiological experiments were performed with a MultiClamp700B (Axon Instruments) amplifier connected to an acquisition board (Digidata 1440; Axon Instruments) attached to a computer running pCLAMP software (Axon Instruments). Axonal fibers from the PFC expressing ChR2 were stimulated in the VLPO by pulses of 470 nm light of 5ms every 5s for 1 to 5 min using a diode laser (pE-2, Coolled). The currents evoked by the photo-stimulations were recorded in voltage-clamp configuration and characterized using the application of the following antagonists: kynurenate (1mM; Sigma); tetrodotoxin (TTX, 1µM; Sigma); 4 aminopyridine (4-AP, 100µM; Sigma). The currents recorded at the same imposed potential were averaged for each cell to perform the quantification. Norepinephrine (NA, 100µM, Sigma) was also applied in the bath to identify the potential induced inhibition characteristic of VLPO sleep promoting neurons[30–34].

Stereotaxic implantations of electrodes and optical fibers

Two weeks following viral injections, mice were anesthetized according to the same procedure as presented above. Isoflurane anesthesia was maintained throughout the surgery between 1.5 to 2% by inhalation. Mice were placed on a stereotaxic frame and the electrodes (tungsten wires) were bilaterally implanted in the olfactory bulb (OB, AP: + 4.3, ML: ± 0.5, DV: -1.5), in the CA1 hippocampal layer (AP: - 2.2, ML: ± 2.0, DV: - 1.0) and the prefrontal cortex (PFC, AP: + 1.95, ML: ± 0.5, DV: -1.5). A reference electrode was placed on the surface of the cerebellum. One or two wires were hooked into the nuchal muscles in two out of five mice for optogenetic experiments, as well as in all mice for chemogenetic experiments. In addition to the electrodes implantation, the optogenetic mice groups were also bilaterally implanted with optical fibers (0.22 mm diameter, spaced 1.4 mm, Doric Lenses Inc, Quebec, Canada) during the same surgery. Fibers were lowered just above the VLPO (AP: + 0.65, ML: ± 0.7, DV: −5.1). On each optical fiber, tetrodes formed by twisting Nichrome wires (0.001” bare) were glued to record the LFP signals from the VLPO. At the end of the implantation, the electrodes and/or optical fibers were fixed to

561 the skull with wax and dental cement (SuperBond C & B). The electrodes were then
562 connected to an EIB32 card held onto the surface of the skull with Parafilm and dental
563 cement. Brain activity was recorded after at least one week of recovery.

564 **Optogenetic protocol**

565 All experiments used 473nm light, delivered using a laser (Laserglow Technology)
566 connected to a rotating connector (Doric Lense). The patch cord is then connected to
567 optical fibers (numerical aperture 0.37) on the animal's head. Mice were habituated to the
568 cables for at least a week before starting the recordings. Recordings were made from
569 around 8:30 a.m. to 6:30 p.m. Photo-stimulations (20 Hz, 30s, 4 mW at the 200 µm fiber
570 tip) were only delivered during sleep by automatically triggering them when the animal's
571 activity measured with a camera (FLIR SC325) fell below a threshold for at least 1 minute.
572 The minimal inter-stimulations-interval was set at 1 minute.

573 **Chemogenetic protocol**

574 The clozapine-N-oxide (CNO, agonist of hM4D(Gi) receptors) was purchased from
575 HelloBio and stored in a freezer at -30°C until use. Before each experiment CNO was
576 diluted to final concentrations and mice were injected intraperitoneally with either CNO
577 (2.5mg/kg) or a vehicle control solution (Saline, NaCl 9g/l). To assess the effect of the
578 PFC-VLPO pathway inhibition on baseline sleep time (i.e without stress) recordings were
579 made from around 8:30 a.m. to 6:30 p.m and mice received the injection at 1pm. To assess
580 the effect of the PFC-VLPO pathway inhibition after the social defeat stress protocol
581 (detailed below) mice received the injection right after the stressful protocol (around
582 10am) and the recordings began right after the injection up to 6:30 pm.

583 **Social defeat stress (SDS) protocol**

584 The social defeat stress procedure used in this study was adapted from a previously
585 published method[35]. The experiment started at 9am. First, the intruder (experimental
586 mouse) was introduced into the home cage of an unfamiliar, aggressive male CD1 resident
587 mouse for5 minutes for physical interactions. If the conflicts were too intense, the mice
588 were briefly separated for a few seconds to avoid wounds and damages to the implant. In
589 a second step, the two mice were separated by a transparent and perforated partition
590 placed in the middle of the CD1 mouse home cage for 20 minutes. During this step, the
591 experimental mouse remained in sensory contact (olfactory, visual and auditory) with the
592 CD1 mouse. In a final step, a second sensory exposure of 20 minutes was repeated in the

experimental mouse's home cage to reinforce the association between its home cage and the stressor. During the stress procedure the experimental mouse usually shows clear submissive posture and freezing behavior. The CD1 mouse was then removed from the cage and the experimental mouse. The experimental mouse was then connected to the recording cable and allowed to sleep for the rest of the day (in its home cage with the partition). The sleep sessions usually started around 10 am up to 6:30 pm.

Elevated Plus-Maze test

The Elevated Plus-Maze test (EPM) was used to test the anxiety-like behaviors of the mice. Following the social defeat stress procedure, a subgroup of mice were taken out and placed in the central area of the elevated plus-maze. The head of mice were randomly placed facing the open arm or closed arm, and then mice moved freely in the maze for 5 min. The behavior of mice submitted to social defeat was compared to a control condition of non-stressed mice. At the end of the test, we cleaned each arm of the EPM with water. The position track of each mouse during the EPM test was recorded. Time in the Open Arm was analyzed using Matlab.

***In vivo* Electrophysiological recordings**

Signals from all electrodes were recorded using an Intan Technologies amplifier chip (RHD2216, sampling rate 20 KHz). Local Fields Potentials (LFP) were sampled and stored at 1250 Hz. Analyses were performed with custom-made Matlab programs, based on generic code that can be downloaded at http://www.battaglia.nl/computing/ and http://fmatoolbox.sourceforge.net/. Local field potentials were recorded using tungsten wires with PFA isolation (0.002" bare). For optogenetic experiments, tetrodes were plated to reduce impedances to around 100 kΩ using gold solution (Neuralynx).

Sleep scoring

An automatic analysis of vigilance states developed in the team[36] was carried out using Matlab software. This analysis is based on the signals of the local field potentials (LFP) of the olfactory bulb (OB) and the hippocampus (HPC). Briefly, the gamma power in the OB is low during both REM and NREM sleep, allowing us to distinguish wakefulness from sleep states. NREM sleep is distinguished from REM sleep based on the theta (5-10Hz) / delta (2-4) power ratio in the HPC. Indeed, during NREM sleep there is a strong presence

of slow waves (high power in the delta band), while theta oscillations are highly prominent during REM sleep.

Histological analysis

After completion of the experiments, mice were deeply anesthetized with intraperitoneal infection of ketamine (1%) and xylazine (1‰). The animals were then perfused transcardially with saline (approximately 50 ml), followed by approximately 50 ml of PFA (4 g/100 mL). Brains were extracted and placed in PFA for postfixation for at least 24 h, transferred to sucrose for at least 48 h, and then cut into 40-µm-thick sections using a cryostat and mounted and stained with hard set Vectashield mounting medium with DAPI (Vectorlabs).

Data analysis and statistics

Data analysis and statistics were performed in the Matlab environment (MathWorks) and R (version 4.2.2). A normality test was performed on each dataset using the Shapiro-Wilk test. The parametric tests (paired or unpaired t-tests, one-way or two-way ANOVAs) were used if datasets were normally distributed or if no non-parametric equivalent was available. For all optogenetic experiments, paired or unpaired t-tests were performed accordingly. Wilcoxon rank sum tests were employed for the effect of the chemogenetic inhibition of the PFC-VLPO pathway under basal conditions (without SDS procedure). One-way ANOVAs or two-way repeated measures ANOVAs were performed accordingly for SDS data. ANOVAs were followed by a post-hoc Wilcoxon rank-sum test with a Benjamini-Hochberg correction (in this case corrected p-values are shown following the convention: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). All results from statistical analysis can be found in the legend of the figures except for the SDS data for which summary tables have been integrated in the Supplementary (related to Figures 1, 2 and 3).

REFERENCES

1. Dement, W. THE OCCURRENCE OF LOW VOLTAGE, FAST, ELECTROENCEPHALOGRAM PATTERNS DURING BEHAVIORAL SLEEP IN THE CAT.

2. Jouvet, M. Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep. Arch Ital Biol 125–206 (1962).

3. Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J. & Scammell, T. E. Sleep State Switching. Neuron 68, 1023–1042 (2010).

4. Scammell, T. E., Arrigoni, E. & Lipton, J. O. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. Neuron 93, 747–765 (2017).

5. Luppi, P.-H. & Fort, P. Neuroanatomical and Neurochemical Bases of Vigilance States. in Sleep-Wake Neurobiology and Pharmacology (eds. Landolt, H.-P. & Dijk, D.-J.) vol. 253 35–58 (Springer International Publishing, Cham, 2018).

6. Allison, T. & Cicchetti, D. V. Sleep in Mammals: Ecological and Constitutional Correlates. Sci. New Ser. 194, 732–734 (1976).

7. Papadimitriou, G. N. & Linkowski, P. Sleep disturbance in anxiety disorders. Int. Rev. Psychiatry 17, 229–236 (2005).

8. Pawlyk, A. C., Morrison, A. R., Ross, R. J. & Brennan, F. X. Stress-induced changes in sleep in rodents: Models and mechanisms. Neurosci. Biobehav. Rev. 32, 99–117 (2008).

9. Sanford, L. D., Suchecki, D. & Meerlo, P. Stress, Arousal, and Sleep. in Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function (eds. Meerlo, P., Benca, R. M. & Abel, T.) vol. 25 379–410 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014).

10.Antila, H. et al. A noradrenergic-hypothalamic neural substrate for stress-induced sleep disturbances. Proc. Natl. Acad. Sci. 119, e2123528119 (2022).

11. Yu, X. et al. A specific circuit in the midbrain detects stress and induces restorative sleep. Science 377, 63–72 (2022).

12. McKlveen, J. M., Myers, B. & Herman, J. P. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. J. Neuroendocrinol. 27, 446–456 (2015).

13. Fuster, J. M. The Prefrontal Cortex—An Update. Neuron 30, 319–333 (2001).

678 14. Chen, P. et al. Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Neurons Control
679 Behavioral Style Selection under Challenging Situations. Neuron 106, 301-315.e7 (2020).

680 15. Chou, T. C. et al. Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus. J. Neurosci. 22, 977–
681 990 (2002).

682 16. Su, Y.-J., Yi, P.-L. & Chang, F.-C. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS)
683 Ameliorates Stress-Induced Sleep Disruption via Activating Infralimbic-Ventrolateral
684 Preoptic Projections. Brain Sci. 14, 105 (2024).

685 17. Economo, C. V. SLEEP AS A PROBLEM OF LOCALIZATION: J. Nerv. Ment. Dis. 71, 249–
686 259 (1930).

687 18. Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W. & Saper, C. B. Activation of Ventrolateral
688 Preoptic Neurons During Sleep. Science 271, 216–219 (1996).

689 19. Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F. & Saper, C. B. Innervation of Histaminergic
690 Tuberomammillary Neurons by GABAergic and Galaninergic Neurons in the Ventrolateral
691 Preoptic Nucleus of the Rat. J. Neurosci. 18, 4705–4721 (1998).

692 20. Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L. & McGinty, D. Sleep–waking discharge
693 patterns of ventrolateral preopticranterior hypothalamic neurons in rats. (1998).

694 21. Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P. & Saper, C. B. Effect of Lesions of the Ventrolateral
695 Preoptic Nucleus on NREM and REM Sleep. J. Neurosci. 20, 3830–3842 (2000).

696 22. Takahashi, K., Lin, J.-S. & Sakai, K. Characterization and mapping of sleep–waking
697 specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. Neuroscience
698 161, 269–292 (2009).

699 23. Chung, S. et al. Identification of preoptic sleep neurons using retrograde labelling and
700 gene profiling. Nature 545, 477–481 (2017).

701 24. Kroeger, D. et al. Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep
702 and heat loss in mice. Nat. Commun. 9, 4129 (2018).

703 25. Suntsova, N., Szymusiak, R., Md. Alam, N., Guzman-Marin, R. & McGinty, D. Sleep-
704 waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. J. Physiol. 543,
705 665–677 (2002).

706 26. Gvilia, I., Turner, A., McGinty, D. & Szymusiak, R. Preoptic Area Neurons and the
707 Homeostatic Regulation of Rapid Eye Movement Sleep. J. Neurosci. 26, 3037–3044 (2006).

708 27. Maurer, J. et al. Homeostatic regulation of REM sleep by the preoptic area of the
709 hypothalamus. Preprint at https://doi.org/10.7554/eLife.92095.1 (2023).

710 28. Hong, J., Lozano, D. E., Beier, K. T., Chung, S. & Weber, F. Prefrontal cortical regulation
711 of REM sleep. Nat. Neurosci. 26, 1820–1832 (2023).

712 29. Numa, C. et al. Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the
713 extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial
714 prefrontal cortex. Sci. Rep. 9, 16670 (2019).

715 30. Gallopin, T. et al. Identi®cation of sleep-promoting neurons in vitro. 404, (2000).

716 31. Gallopin, T. et al. The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-
717 promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. Neuroscience
718 134, 1377–1390 (2005).

719 32. Matsuo, S., Jang, I.-S., Nabekura, J. & Akaike, N. α 2 -Adrenoceptor-Mediated
720 Presynaptic Modulation of GABAergic Transmission in Mechanically Dissociated Rat
721 Ventrolateral Preoptic Neurons. J. Neurophysiol. 89, 1640–1648 (2003).

722 33. Saint-Mleux, B. et al. Nicotinic Enhancement of the Noradrenergic Inhibition of Sleep-
723 Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Area. J. Neurosci. 24, 63–67 (2004).

724 34. Liu, Y.-W., Li, J. & Ye, J.-H. Histamine regulates activities of neurons in the
725 ventrolateral preoptic nucleus: Histamine regulates hypothalamic neurons. J. Physiol.
726 588, 4103–4116 (2010).

727 35. Henderson, F., Vialou, V., El Mestikawy, S. & Fabre, V. Effects of Social Defeat Stress
728 on Sleep in Mice. Front. Behav. Neurosci. 11, 227 (2017).

729 36. Bagur, S. et al. Harnessing olfactory bulb oscillations to perform fully brain-based
730 sleep-scoring and real-time monitoring of anaesthesia depth. PLOS Biol. 16, e2005458
731 (2018).

732 37. McShane, B. B. et al. Assessing REM Sleep in Mice Using Video Data. Sleep 35, 433–442
733 (2012).

734 38. Yaghouby, F., O'Hara, B. F. & Sunderam, S. Unsupervised Estimation of Mouse Sleep
735 Scores and Dynamics Using a Graphical Model of Electrophysiological Measurements.
736 Int. J. Neural Syst. 26, 1650017 (2016).

737 39. Trachsel, L., Tobler, I., Achermann, P. & Borbély, A. A. Sleep continuity and the REM-
738 nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation. Physiol.
739 Behav. 49, 575–580 (1991).

740 40. Mellman, T. A., Bustamante, V., Fins, A. I., Pigeon, W. R. & Nolan, B. REM Sleep and the
741 Early Development of Posttraumatic Stress Disorder. Am. J. Psychiatry 159, 1696–1701
742 (2002).

743 41. DaSilva, J. K. et al. Social partnering significantly reduced rapid eye movement sleep
744 fragmentation in fear-conditioned, stress-sensitive Wistar-Kyoto rats. Neuroscience 199,
745 193–204 (2011).

746 42. Muzur, A., Pace-Schott, E. F. & Hobson, J. A. The prefrontal cortex in sleep. Trends
747 Cogn. Sci. 6, 475–481 (2002).

748 43. Chang, C. H., Chen, M. C., Qiu, M. H. & Lu, J. Ventromedial prefrontal cortex regulates
749 depressive-like behavior and rapid eye movement sleep in the rat. Neuropharmacology
750 86, 125–132 (2014).

751 44. Georgiou, P. et al. Experimenters' sex modulates mouse behaviors and neural
752 responses to ketamine via corticotropin releasing factor. Nat. Neurosci. 25, 1191–1200
753 (2022).

754 45. Saper, C. B., Chou, T. C. & Scammell, T. E. The sleep switch: hypothalamic control of
755 sleep and wakefulness. Trends Neurosci. 24, 726–731 (2001).

756 46. Arrigoni, E. & Fuller, P. M. The Sleep-Promoting Ventrolateral Preoptic Nucleus: What
757 Have We Learned over the Past 25 Years? Int. J. Mol. Sci. 23, 2905 (2022).

758 47. Cvetkovic, V. et al. Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons
759 supplying both cortical and neuroendocrine projections. Neuroscience 116, 31–35 (2003).

760 48. Luppi, P.-H. et al. Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. Pflüg.
761 Arch. - Eur. J. Physiol. 463, 43–52 (2012).

762 49. Lu, J., Sherman, D., Devor, M. & Saper, C. B. A putative flip–flop switch for control of
763 REM sleep. Nature 441, 589–594 (2006).

764 50. Hsieh, K.-C. et al. c-Fos expression in neurons projecting from the preoptic and lateral
765 hypothalamic areas to the ventrolateral periaqueductal gray in relation to sleep states.
766 Neuroscience 188, 55–67 (2011).

767 51. Weber, F. et al. Regulation of REM and Non-REM Sleep by Periaqueductal GABAergic
768 Neurons. Nat. Commun. 9, 354 (2018).

769 52. Sakai, K. & Crochet, S. Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons
770 in relation to behavior and wake–sleep states. Neuroscience 104, 1141–1155 (2001).

771 53. Lu, J. et al. Selective Activation of the Extended Ventrolateral Preoptic Nucleus during
772 Rapid Eye Movement Sleep. J. Neurosci. 22, 4568–4576 (2002).

773 54. Tossell, K. et al. Somatostatin neurons in prefrontal cortex initiate sleep-preparatory
774 behavior and sleep via the preoptic and lateral hypothalamus. Nat. Neurosci. 26, 1805–
775 1819 (2023).

776 55. Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A. & Saper, C. B. Ventrolateral preoptic
777 nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species.
778 Neuroscience 115, 285–294 (2002).

779 56. Fujii, S., Kaushik, M. K., Zhou, X., Korkutata, M. & Lazarus, M. Acute Social Defeat Stress
780 Increases Sleep in Mice. Front. Neurosci. 13, 322 (2019).

781 57. Feng, X. et al. Anxiolytic Effect of Increased NREM Sleep after Acute Social Defeat
782 Stress in Mice. Neurosci. Bull. 36, 1137–1146 (2020).

783 58. Wells, A. M. et al. Effects of Chronic Social Defeat Stress on Sleep and Circadian
784 Rhythms Are Mitigated by Kappa-Opioid Receptor Antagonism. J. Neurosci. 37, 7656–
785 7668 (2017).

786 59. Dillon, R. F. & Webb, W. B. Threshold of arousal from 'activated' sleep in the rat. J.
787 Comp. Physiol. Psychol. 59, 446–447 (1965).

788 60. Twyver, H. V. & Garrett, W. Department of Psychology, Florida Technological
789 University, Orlando, Florida 32816.

790 61. Rasch, B., Büchel, C., Gais, S. & Born, J. Odor Cues During Slow-Wave Sleep Prompt
791 Declarative Memory Consolidation. Science 315, 1426–1429 (2007).

792 62. Kato, T., Montplaisir, J. Y. & Lavigne, G. J. Experimentally induced arousals during
793 sleep: a cross-modality matching paradigm. J. Sleep Res. 13, 229–238 (2004).

794 63. Lyamin, O. I. et al. Fur Seals Suppress REM Sleep for Very Long Periods without
795 Subsequent Rebound. Curr. Biol. 28, 2000-2005.e2 (2018).

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1. The social defeat stress protocol induces a long-lasting REM sleep fragmentation

A. Experimental timeline. The social defeat stress (SDS) procedure, adapted from Henderson et al., 2017, was followed by either sleep recording or behavioral testing using the elevated plus maze (EPM). **B.** Comparison of trajectories in the EPM between a representative control non-stressed mouse (black) and a mouse submitted to SDS (orange), illustrating behavioral changes. **C.** Percentage of time spent in the open arms of the EPM, indicating stress-induced anxiety-like behavior. Boxplots show the median and interquartile range (Wilcoxon rank sum test: zval=2.5433, p=0.0110, ctrl n=11, SDS n=10). **D-F.** Percentage of time spent awake (D), in NREM sleep (E) and in REM sleep (F) during the sleep session for control and SDS mice. **G.** Number of REM sleep bouts over the sleep session for control and SDS mice. **H.** Mean duration of REM sleep bouts for control and SDS mice during the sleep session. **I.** Summary of the stress-induced sleep modifications. D-H: data are represented as mean ± SEM for control (gray, n=14) and SDS (orange, n=11) groups. Statistical significance was determined using a two-way repeated measures ANOVA, followed by a post-hoc Wilcoxon rank sum test with Benjamini-Hochberg correction (for more details see Table S6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

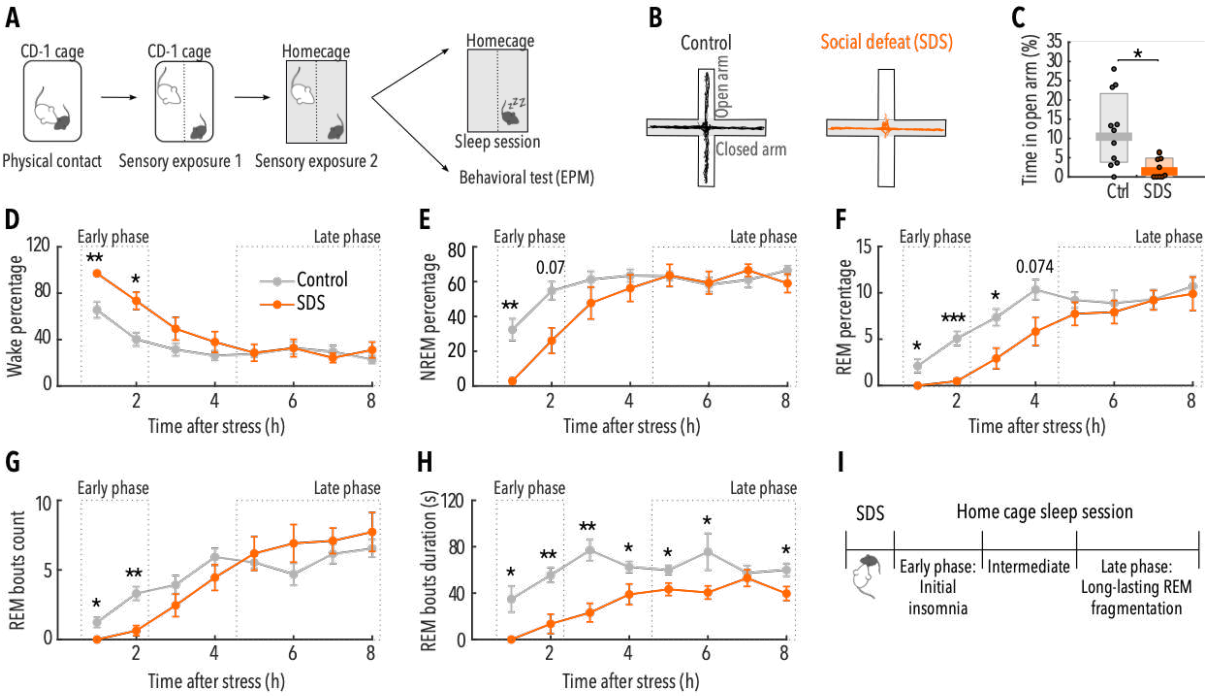

A
CD-1 cage
CD-1 cage
Homecage
Physical contact
Sensory exposure 1
Sensory exposure 2
Homecage
Sleep session
Behavioral test (EPM)
B
Control
Social defeat (SDS)
Open arm
Closed arm
C
Time in open arm (%)
Ctrl
SDS
D
Early phase
Late phase
Wake percentage
Control
SDS
Time after stress (h)
E
Early phase
Late phase
NREM percentage
0.07
Time after stress (h)
F
Early phase
Late phase
REM percentage
0.074
Time after stress (h)
G
Early phase
Late phase
REM bouts count
Time after stress (h)
H
Early phase
Late phase
REM bouts duration (s)
Time after stress (h)
I
SDS
Home cage sleep session
Early phase: Initial insomnia
Intermediate
Late phase: Long-lasting REM fragmentation

Figure 2. The chemogenetic inhibition of the PFC-VLPO pathway rescues the REM sleep fragmentation induced by stress

A. Schematic illustrating the injection of viral vectors to express the hM4Di receptors specifically in the PFC-VLPO pathway and electrodes implantations into the OB, PFC and HPC. **B.** Experimental timeline. Following the SDS mice received an injection of saline or CNO and were recorded for the sleep session afterwards. Quantifications are shown for the early and late phases of the sleep session. **C.** Epifluorescence image of a representative brain slice showing the GFP fluorescence at the VLPO injection site (scale bar, 1 mm). **D.** Epifluorescence image of a representative slice showing mCherry and GFP co-labeled neurons in the PFC (scale bar, 1 mm). **E**. Confocal images showing an enlargement of retrogradely labeled GFP neurons expressing the Cre-recombinase (i), mCherry neurons with hM4Di receptors (ii), and their overlap (iii) (Scale bar, 50 μm). **F.** Representative examples of hypnograms during a portion of the early (left) and late (right) phases of the sleep session, highlighting no REM sleep fragmentation in SDS+dreadd+CNO mice versus control mice submitted to SDS. **G-K.** Percentage of wakefulness (**G**), NREM sleep (**H**), REM sleep (**I**), number of REM sleep bouts (**J**) and mean duration of REM sleep bouts (**K**) during the early phase of the sleep session. **L-P.** Percentage of wakefulness (**L**), NREM sleep (**M**), REM sleep (**N**), number of REM sleep bouts (**O**) and mean duration of REM sleep bouts (**P**) during the late phase of the sleep session.

Boxplots show median and interquartile for control (non-stressed mice, gray, n=14), SDS+mCherry+saline (orange, n=11), SDS+mCherry+CNO (red, n=11) and SDS+dreadd+CNO (dark green, n=6). Statistical significance was assessed using a two-way repeated measures ANOVA, followed by a post-hoc Wilcoxon rank sum test with Benjamini-Hochberg correction (see Table S7 for details, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

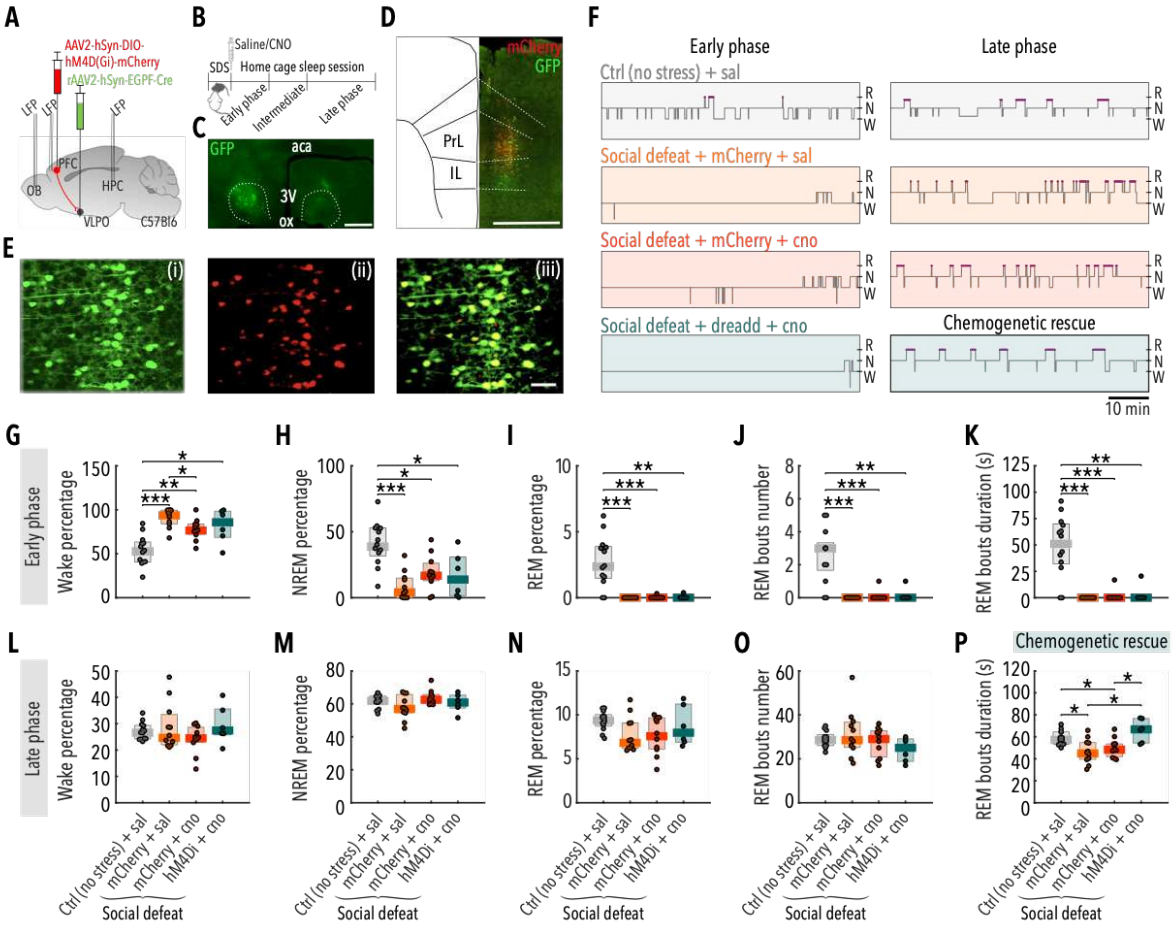

A
AAV2-hSyn-DIO-
hM4D(Gi)-mCherry
rAAV2-hSyn-EGPF-Cre
LFP
PFC
HPC
OB
VLPO
C57Bl6
B
Saline/CNO
SDS
Home cage sleep session
Early phase
Intermediate
Late phase
C
GFP
aca
3V
ox
D
mCherry
GFP
PrL
IL
E
(i)
(ii)
(iii)
F
Early phase
Late phase
Ctrl (no stress) + sal
Social defeat + mCherry + sal
Social defeat + mCherry + cno
Social defeat + dreadd + cno
Chemogenetic rescue
R
N
W
10 min
G
Early phase
Wake percentage
H
NREM percentage
I
REM percentage
J
REM bouts number
K
REM bouts duration (s)
L
Late phase
Wake percentage
M
NREM percentage
N
REM percentage
O
REM bouts number
P
Chemogenetic rescue
REM bouts duration (s)
Ctrl (no stress) + sal
mCherry + sal
mCherry + cno
hM4Di + cno
Social defeat

Figure 3. The SDS induces short REM sleep bouts during the late phase that are abolished upon chemogenetic inhibition of the PFC-VLPO pathway

A. Experimental timeline. Following the SDS mice received an injection of saline or CNO and were recorded for the sleep session afterwards. Quantifications are shown only during the late phase of the sleep session. **B.** Mean duration of REM sleep bouts of increasing length. Note that starting from 25s, there is no longer a difference between the control groups submitted to SDS (SDS+mCherry+sal and SDS+mCherry+CNO) compared to the non-stressed control group (gray line) and the rescued group (SDS+dreadd+CNO), establishing 25s as the threshold to distinguish between short and long REM sleep bouts. **C.** Mean duration of REM sleep bouts excluding bouts under 25s (see panel B) during the late phase of the sleep session. Note that no REM sleep fragmentation is observed when short bouts are not considered (unlike Fig. 2N). **D.** Percentage of short REM sleep bouts (shorter than 25s) during the late phase of the sleep session. **E.** Averaged power spectra (left) in the hippocampus during the late phase of the sleep session, with quantifications of the frequency (middle) and power (right) at the peak. **F.** Same as E, But for typical REM sleep bouts. **G.** Example of a short REM sleep bout (duration = 7,6s) from a SDS mouse showing the low frequency hippocampal spectrogram, with the corresponding hypnogram above, LFP signals in the HPC and the EMG traces (scale bar, 0.2 mV, left). Zooms in LFP and EMG signals (right) corresponding to the colored rectangles are shown for NREM sleep (blue) and REM sleep (purple). **H.** Same as G, but for a typical REM sleep bout (duration = 64,3s). Note the very similar signals between the short and the typical REM sleep bouts.

In all panels, boxplots show median and interquartile range for controls (non-stressed mice, gray, n=14), SDS+mCherry+saline (orange, n=11), SDS+mCherry+CNO (red, n=11) and SDS+dreadd+CNO (dark green, n=6). Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test followed by the Benjamini-Hochberg correction (for more details see Table S8., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

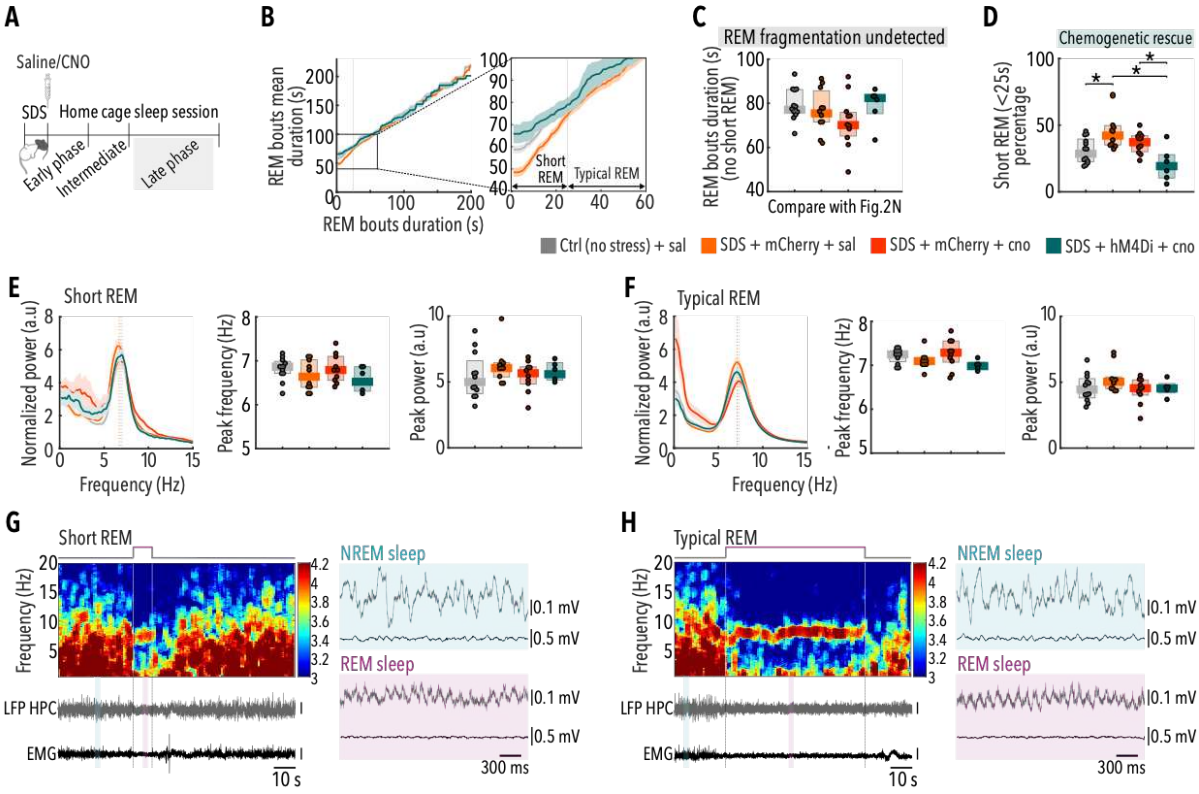

A
Saline/CNO
SDS
Home cage sleep session
Early phase
Intermediate
Late phase
B
REM bouts mean duration (s)
REM bouts duration (s)
Short REM
Typical REM
C
REM fragmentation undetected
REM bouts duration (s) (no short REM)
Compare with Fig.2N
D
Chemogenetic rescue
Short REM (<25s) percentage
Ctrl (no stress) + sal
SDS + mCherry + sal
SDS + mCherry + cno
SDS + hM4Di + cno
E
Short REM
Normalized power (a.u)
Frequency (Hz)
Peak frequency (Hz)
Peak power (a.u)
F
Typical REM
G
Short REM
NREM sleep
REM sleep
LFP HPC
EMG
0.1 mV
0.5 mV
10 s
300 ms
H
Typical REM

Figure 4. Optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway is sufficient to induce the REM sleep fragmentation

A. Top: schematic representation of the electrodes implanted in the OB, HPC and PFC, with bilateral optical fibers above the VLPO for light delivery. Middle: representative example of ChannelRhodopsin-2 virus injection in the PFC. Bottom: representative example of a coronal slice showing the location of optical fibers above the VLPO. **B.** Average HPC spectrogram for 9 stimulations triggered in REM sleep for a mCherry mouse (left) and for 7 stimulations in a ChR2 mouse (right). **C.** Quantification of the average theta (5-9Hz) / delta (2-4Hz) power ratio during the 30s before (white bars) and during (colored bars) REM sleep stimulations for mCherry and ChR2 mice (paired t-test, mCherry laser OFF vs ON: t (4)=2.3431, p=0.07911; ChR2 laser OFF vs ON: t(4)=4.9958, p=0.007513). **D.** Left: percentage of wakefulness over time during REM sleep stimulations for mCherry and ChR2 mice. 0s represents stimulation onset. Right: average percentage of wakefulness during the 30s stimulation time window (unpaired t-test: t(8)=1.036, p=0.3305). **E.** Same as D. but for NREM sleep percentage (unpaired t-test: t (8)=2.7532, p=0.0249). **F.** Same as D. but for REM sleep percentage (unpaired t-test: t(8)=-2.865, p=0.02099). **G.** Left: ripples occurrence during REM sleep stimulations for mCherry and ChR2 mice. Right: representative example of ripples waveform for a mCherry and a ChR2 mouse. **H.** Average ripples occurrence during 30s of stimulations triggered in REM sleep (unpaired t-test: t (8)=2.6037, p=0.03144)**. I.** REM sleep bouts number averaged over the whole sleep session for mCherry and ChR2 mice (unpaired t-test: t(4.3743)=1.6696, p=0.1642). **J.** REM sleep bouts duration averaged over the whole sleep session for mCherry and ChR2 mice (unpaired t-test: t(8)=-2.3671, p=0.04545). **K.** Summary diagram: the photo-activation of the PFC-VLPO pathway during REM sleep decreases the likelihood of remaining in REM sleep and increases the probability to transit to NREM sleep (Fig. S4), leading to REM sleep fragmentation. Data are represented as mean ± SEM for mCherry mice (n=5, gray) and ChR2 mice (n=5, blue). Blue rectangles represent the photo-stimulations (laser ON, 470nm, 20Hz, 30s).

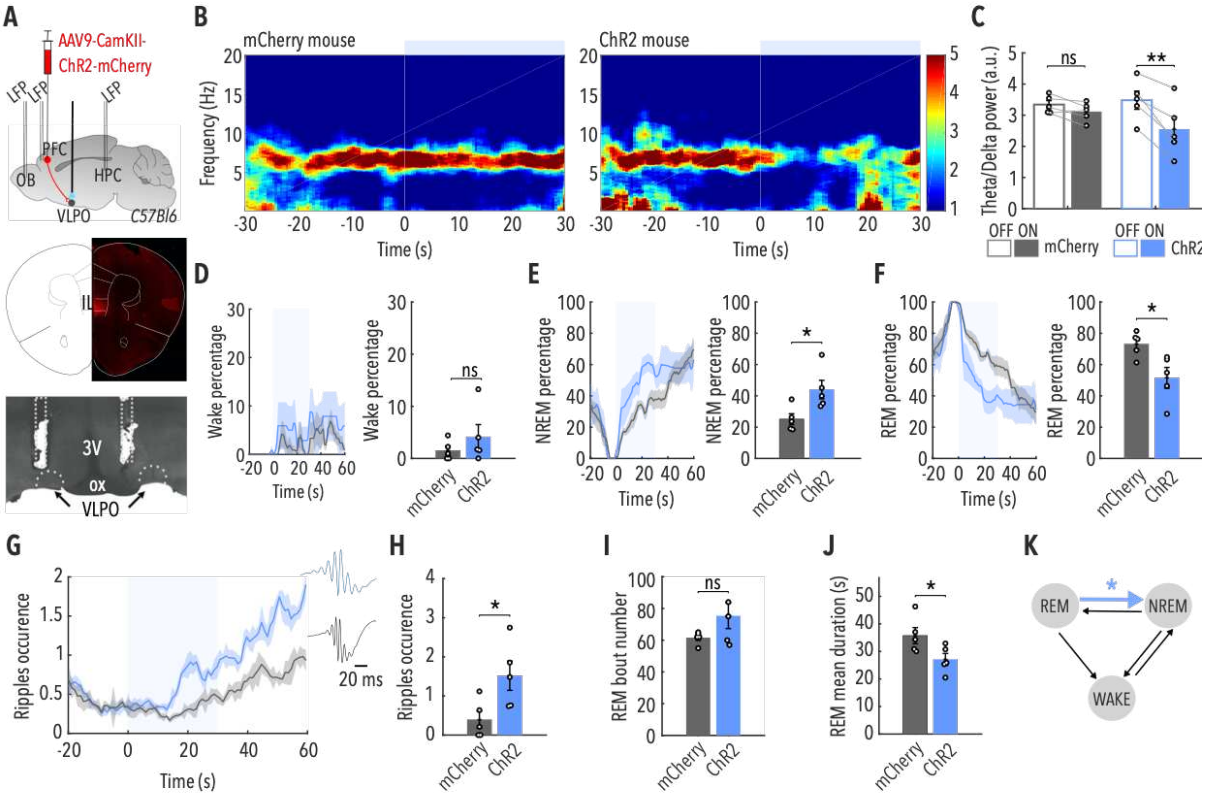
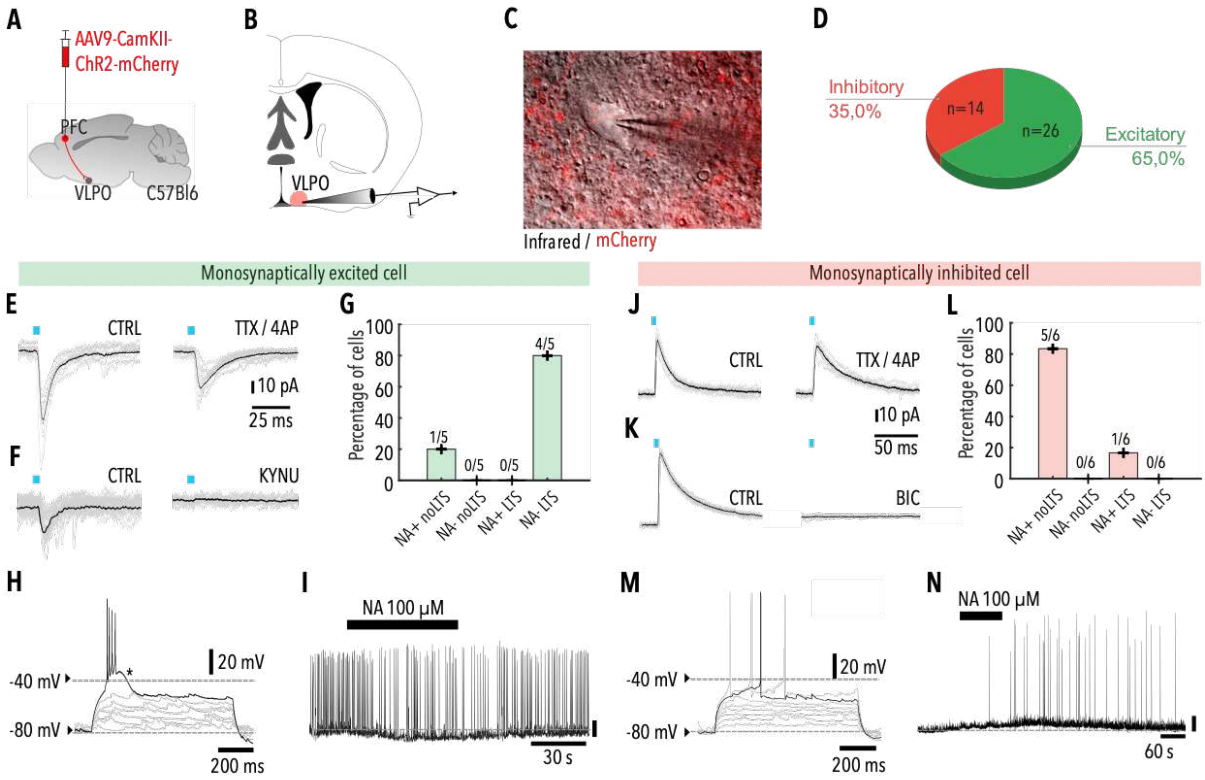

A
AAV9-CamKII-
ChR2-mCherry
LFP
LFP
LFP
PFC
OB
HPC
VLPO
C57Bl6
IL
3V
ox
VLPO
B
mCherry mouse
ChR2 mouse
Frequency (Hz)
Time (s)
C
Theta/Delta power (a.u.)
ns
**
OFF ON
mCherry
OFF ON
ChR2
D
Wake percentage
Time (s)
ns
mCherry
ChR2
E
NREM percentage
Time (s)
*
F
REM percentage
Time (s)
*
G
Ripples occurence
Time (s)
20 ms
H
Ripples occurence
*
I
REM bout number
ns
J
REM mean duration (s)
*
K
REM
NREM
WAKE

Figure 5. Ex vivo characterization of VLPO neurons targeted by cortical afferents. **A.** Schematic illustrating the injection of a viral vector to express ChannelRhodopsin2 in PFC neurons. **B.** Schematic of mouse brain slice preparation for ex vivo patch-clamp recordings of VLPO neurons. **C.** Infrared and fluorescence micrographs illustrating a VLPO neuron during patch-clamp recording. mCherry-tagged axonal projections contact the neuron body (scale bar: 20 μm). **D.** Pie chart of neurons responding to optogenetic stimulation with either excitatory (green) or inhibitory (red) currents. **E.** Average excitatory postsynaptic current (EPSC) traces elicited by photostimulation under control conditions and with TTX/4AP, at -60 mV. **F.** EPSC traces under control conditions and in the presence of kynurenate in a representative responsive neuron. **G.** Diagram of neuron responses to optogenetic stimulation and subsequent noradrenaline-induced hyperpolarization, with 4/5 exhibiting LTS and a noradrenaline-induced inhibition, and 1 depolarized without LTS. **H.** Voltage responses to +10 pA steps at -80 mV, showing EPSC following photostimulation and a low-threshold spike (LTS) (star). **I.** Noradrenaline-induced hyperpolarization in a neuron responding to an EPSC triggered by optogenetic stimulation. **J-K.** Average inhibitory postsynaptic current (IPSC) traces in control and with TTX/4AP (J) or Bicuculline (K), from representative neurons. **L.** Neuron distribution responding to optogenetic stimulation with an IPSC and a noradrenaline-induced depolarization. All 6 cells were depolarized by noradrenaline, and 5 lacking LTS. **M.** Voltage responses to +10 pA steps from a neuron at -80 mV, devoiding a LTS and responding to an IPSC evoked by photostimulation. **N.** Noradrenaline-induced depolarization in a neuron responding to an IPSC triggered by optogenetic stimulation.


A
AAV9-CamKII-
ChR2-mCherry
PFC
VLPO
C57Bl6
B
VLPO
C
Infrared / mCherry
D
Inhibitory
35,0%
n=14
n=26
Excitatory
65,0%
Monosynaptically excited cell
Monosynaptically inhibited cell
E
CTRL
TTX / 4AP
10 pA
25 ms
F
CTRL
KYNU
G
Percentage of cells
1/5
0/5
0/5
4/5
NA+ noLTS
NA- noLTS
NA+ LTS
NA- LTS
J
CTRL
TTX / 4AP
10 pA
50 ms
K
CTRL
BIC
L
Percentage of cells
5/6
0/6
1/6
0/6
NA+ noLTS
NA- noLTS
NA+ LTS
NA- LTS
H
-40 mV
-80 mV
20 mV
200 ms
I
NA 100 µM
30 s
M
-40 mV
-80 mV
20 mV
200 ms
N
NA 100 µM
60 s

SUPPLEMENTARY

Figure S1. Ex vivo validation of the CNO effect on PFC neurons expressing the hM4Di receptors

A. Left: superimposed infrared and fluorescence microphotographs of a PFC neuron recorded in patch-clamp conditions (scale bar, 20 μm). Right: Firing pattern of the recorded neuron submitted to successive current steps. **B.** The upper panel illustrates a hyperpolarization of mCherry-labeled neurons following bath application of CNO (10 μM). During recording, hyperpolarizing (-20 pA) and depolarizing (-20 pA) current steps were elicited at regular intervals. The lower panels show enlargements of the voltage responses before CNO application (i) and during the effect of the CNO (ii). Note that the spontaneous action potential (AP) at baseline (red arrowheads) disappears during the CNO effect. The AP discharge frequency is also decreased in response to the depolarizing current step during the CNO effect.

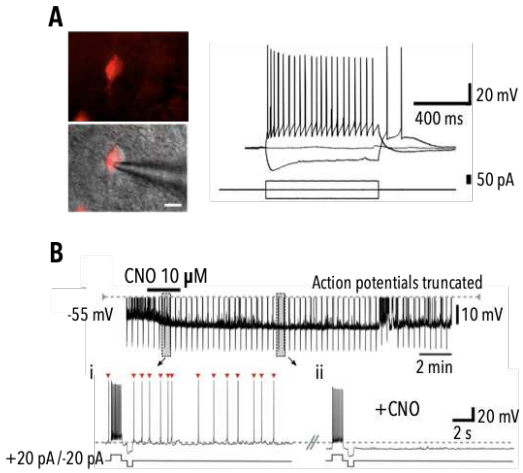
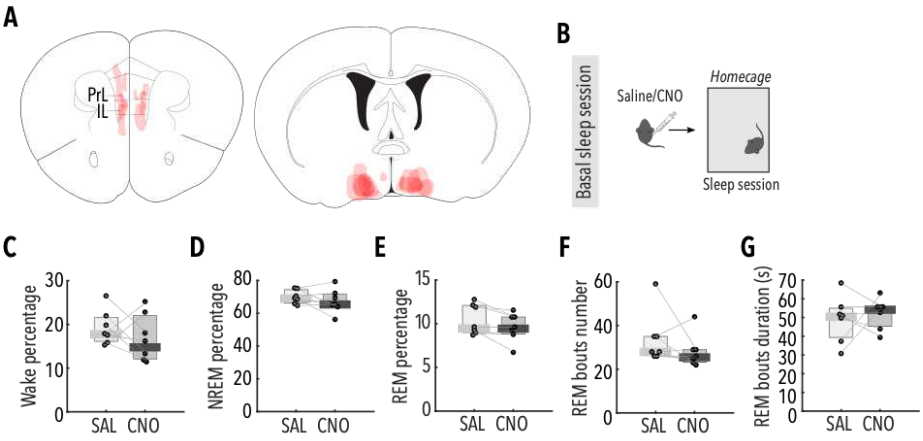

A
20 mV
400 ms
50 pA
B
CNO 10 µM
Action potentials truncated
-55 mV
10 mV
2 min
i
ii
+CNO
20 mV
2 s
+20 pA/-20 pA

Figure S2. The chemogenetic inhibition of the VLPO-projecting PFC neurons has no effect under basal sleep condition

A. Reconstruction of the areas in the infralimbic and prelimbic parts of the PFC where neurons expressing the hM4Di receptors were found for all mice (left). Reconstruction of the viral vector injection sites in the VLPO for all mice (right). **B.** Experimental timeline for a baseline sleep session. Mice received an injection of saline or CNO at 1pm in order to inhibit the VLPO-projecting PFC neurons and were recorded for the sleep session afterwards. **C.** Percentage of wakefulness during the basal sleep session after injection of either saline or CNO in hM4Di mice (Wilcoxon signed-rank test: signed rank statistic=21, p=0.2969). **D.** Same as C, but for NREM sleep (Wilcoxon signed-rank test: signed rank statistic=16, p=0.8125). **E.** Same as C, but for REM sleep (Wilcoxon signed-rank test: signed rank statistic=24, p=0.1094). **F.** Number of REM sleep bouts during the basal sleep session after injection of either saline or CNO in hM4Di mice (Wilcoxon signed-rank test: signed rank statistic=15.5, p=0.3441). **G.** Mean duration of REM sleep bouts during the basal sleep session after injection of either saline or CNO in hM4Di mice (Wilcoxon signed-rank test: signed rank statistic=13, p=0.9375).

Boxplots show the median and interquartile range for saline and CNO treatments in hM4Di mice (n=7).


A
PrL
IL
B
Basal sleep session
Saline/CNO
Homecage
Sleep session
C
Wake percentage
D
NREM percentage
E
REM percentage
F
REM bouts number
G
REM bouts duration (s)
SAL CNO

.

Figure S3. The chemogenetic inhibition of the PFC has no effect on basal sleep but decreases REM sleep percentage after social defeat stress

A. Left: schematic illustrating the injection of a viral vector to express the hM4Di receptors in the PFC and the location of electrodes implantations. Right: epifluorescence image of a representative viral vector injection site, indicated by mCherry fluorescence in the prelimbic and infralimbic regions of the PFC. **B.** Experimental timeline for a baseline sleep session. Mice received an injection of saline or CNO at 1pm in order to inhibit the PFC and were recorded for the sleep session afterwards (n=7). **C-G.** Percentage of wakefulness (Wilcoxon rank sum test: rank sum value=38, p=0.09732, C), NREM sleep (Wilcoxon rank sum test: rank sum value=25, p=1, D), REM sleep (Wilcoxon rank sum test: rank sum value=29, p=0.62, E), number of REM sleep bouts (Wilcoxon rank sum test: rank sum value=26, p=0.8977, F) and mean duration of REM sleep bouts (Wilcoxon rank sum test: rank sum value=27, p=0.8048, G) during the basal sleep session after injection of either saline or CNO. **H.** Experimental timeline for a sleep session after stress. Following the SDS mice received an injection of saline or CNO and were recorded for the sleep session afterwards. Quantifications are shown for the early and late phases of the sleep session. The PFC inhibition group (light green, n=5) was compared to the previous control groups used in the main figures. **I-M**. Percentage of wakefulness (I), NREM sleep (J), REM sleep (K), number of REM sleep bouts (L) and mean duration of REM sleep bouts (M) during the early phase of the sleep session. **N-R**. Percentage of wakefulness (N), NREM sleep (O), REM sleep (P), number of REM sleep bouts (Q) and mean duration of REM sleep bouts (R) during the late phase of the sleep session.

(I-R) Boxplots show median and interquartile range for control condition (non-stressed mice, gray, n=14), SDS+mCherry+saline (orange, n=11), SDS+mCherry+CNO (red, n=11) and SDS+dreadd+CNO (dark green, n=5). A two-way repeated measures ANOVA, followed by a post-hoc Wilcoxon rank sum test with Benjamini-Hochberg correction was used to determine statistical significance (for more details see Suppl., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

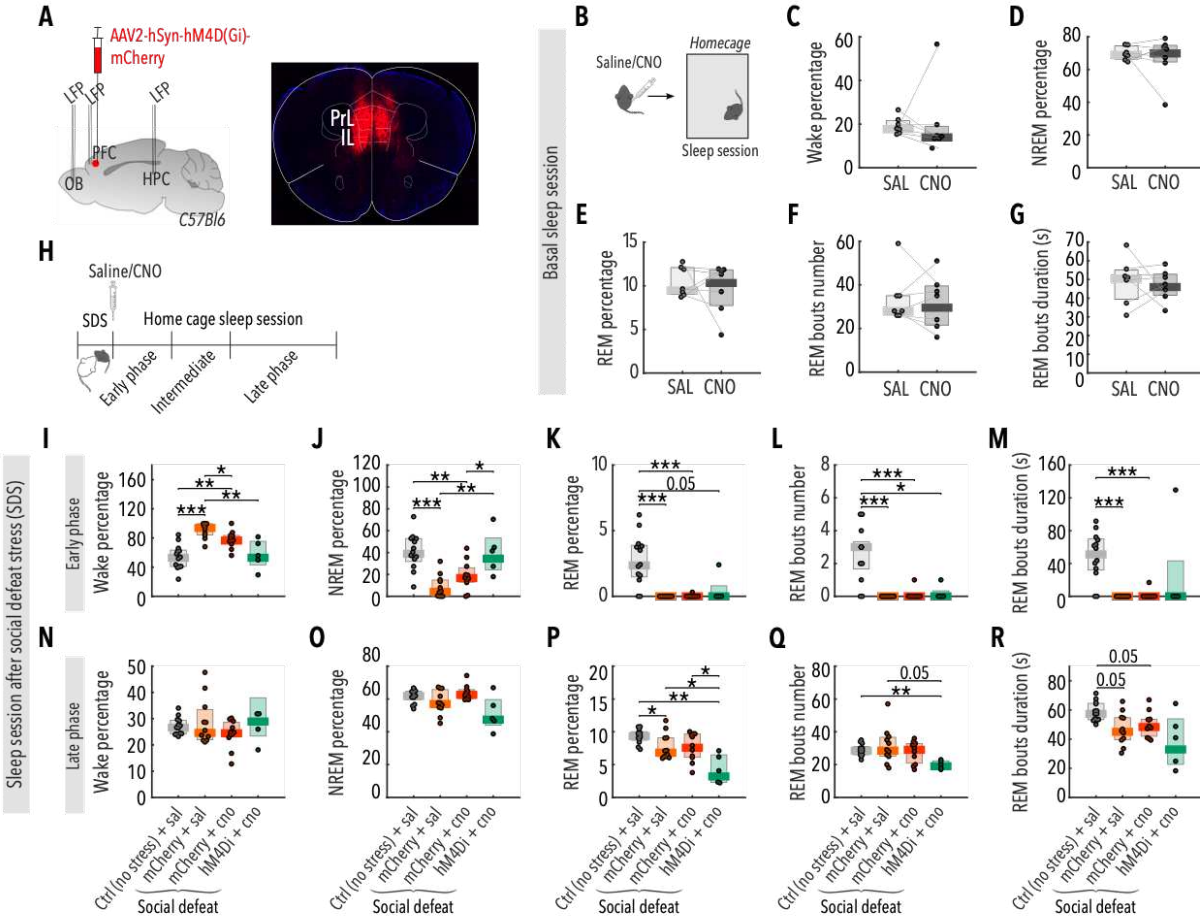

A
AAV2-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry
LFP
PFC
OB
HPC
C57Bl6
PrL
IL
B
Homecage
Saline/CNO
Sleep session
Basal sleep session
C
Wake percentage
D
NREM percentage
E
REM percentage
F
REM bouts number
G
REM bouts duration (s)
SAL CNO
H
Saline/CNO
SDS
Home cage sleep session
Early phase
Intermediate
Late phase
Sleep session after social defeat stress (SDS)
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
Ctrl (no stress) + sal
mCherry + sal
mCherry + cno
hM4Di + cno
Social defeat

Figure S4. The optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway during REM sleep facilitates the transition toward NREM sleep

A. Reconstruction of the injection sites of the viral vector (AAV9-CaMKII-ChR2-mCherry) for all mice. **B.** Epifluorescence images of a representative example of the PFC terminals labeled with mCherry at the level of the VLPO. **C.** Transition probability from REM to NREM sleep averaged over the whole sleep session for mCherry and ChR2 mice (unpaired t-test: t (6.2394) =-2.6323, p=0.03754). **D.** Transition probability from REM sleep to wakefulness averaged over the whole sleep session for mCherry and ChR2 mice (unpaired t-test: t (4.5562) =0.33633, p=0.7515).

Data are presented as mean ± SEM for mCherry mice (n=5, gray) and ChR2 mice (n=5, blue).

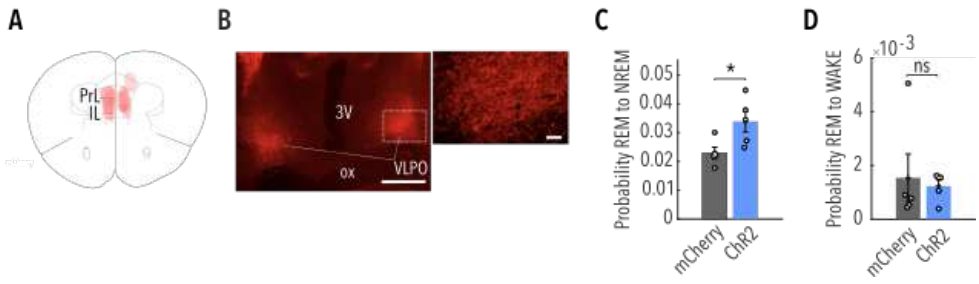

A
B
C
D
PrL
IL
3V
ox
VLPO
Probability REM to NREM
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
*
mCherry
ChR2
Probability REM to WAKE
6
4
2
0
×10-3
ns
mCherry
ChR2

Figure S5. The optogenetic activation of the PFC-VLPO pathway has no effect during NREM sleep

A. Representative examples of PFC spectrograms centered and averaged on stimulations triggered in NREM sleep for a mCherry mouse (left, n = 218 stims) and for a ChR2 mouse (right, n = 191 stims). **B.** Quantification of the average delta (2-4Hz) power during the 30s time windows before (white bars) and during photo-stimulations (colored bars) triggered in NREM sleep for mCherry and ChR2 mice (paired t-test, mCherry laser OFF vs ON: t=-1.1136, p= 0.3279; ChR2 laser OFF vs ON: t=0.86268, p= 0.437). **C.** Left: percentage of wakefulness as a function of time during photo-stimulations triggered in NREM sleep for mCherry (gray) mice and ChR2 mice (blue). 0s represents stimulation onset. Right: average percentage of wakefulness during the 30s stimulation time window (unpaired t-test: t (4.4589) =1, p=0.3673). **D.** Same as C. but for NREM sleep percentage (unpaired t-test: t (8) =-0.35761, p=0.7299). **E.** Same as C. but for REM sleep percentage (unpaired t-test: t (8) =-1.1658, p=0.2773). **F.** Ripples occurrence as a function of time during photo-stimulations occurring in NREM sleep for mCherry mice (gray) and ChR2 mice (blue). **G.** Average quantification of the ripples occurrence in the 30s of photo-stimulations triggered in NREM sleep (unpaired t-test: t (8) =0.14513, p=0.8882). **H.** Number of NREM sleep bouts averaged over the whole sleep session for mCherry and ChR2 mice (unpaired t-test: t (8) =0.76024, p=0.4689). **I.** Mean duration of NREM sleep bouts averaged over the whole sleep session for mCherry and ChR2 mice (unpaired t-test: t (8) =-0.79774, p=0.448). Data are presented as mean ± SEM for mCherry mice (n=5, gray) and ChR2 mice (n=5, blue). Blue rectangles represent the photo-stimulations (laser ON, 470nm, 20Hz, 30s).

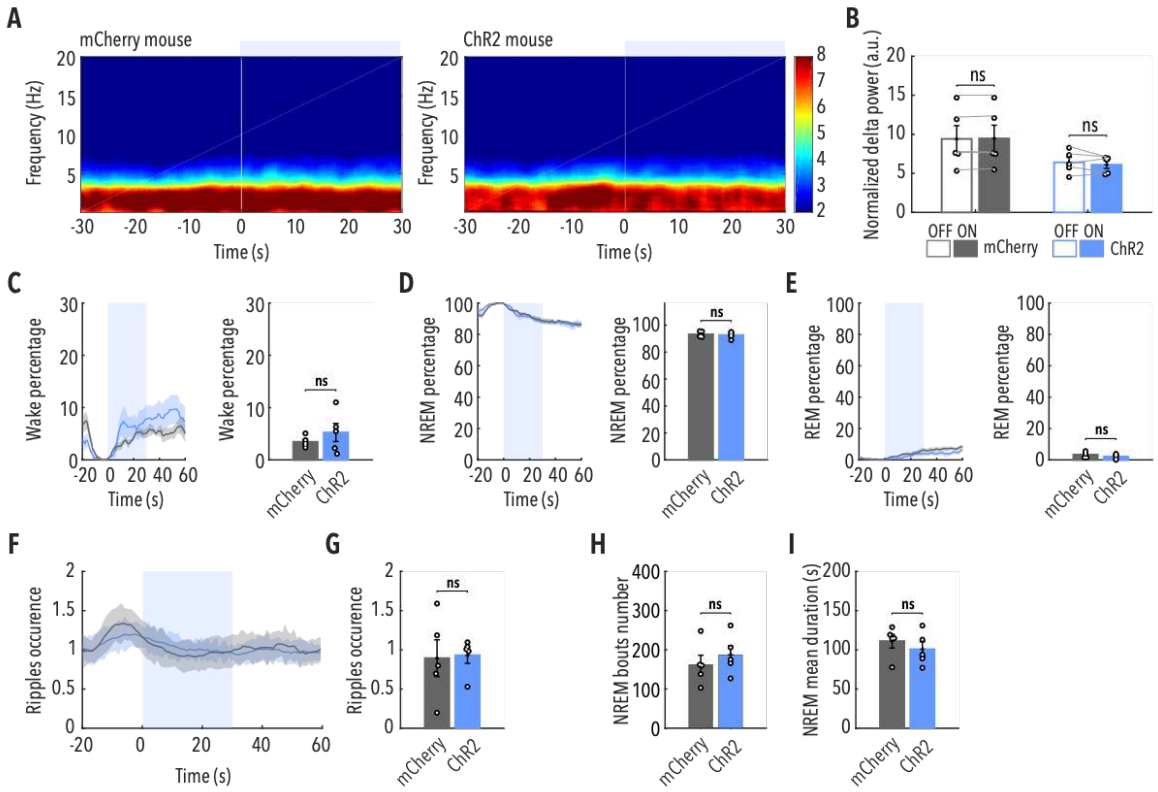

A
mCherry mouse
ChR2 mouse
Frequency (Hz)
Time (s)
B
Normalized delta power (a.u.)
ns
OFF ON
mCherry
ChR2
C
Wake percentage
D
NREM percentage
E
REM percentage
F
Ripples occurence
G
H
NREM bouts number
I
NREM mean duration (s)

Table S6. Summary table of statistics related to Figure 1

Table shows descriptive statistics for each group, the statistical tests used to compare groups between each other and adjusted p-values. Each line corresponds to one panel on Figure 1.

	ctrl group	SD group	Two-way repeated mesures ANOVA	Wilcoxon rank sum test		adjusted p-value (Benjamini-Hochberg)
	mean	mean		zval	p-value	
Percentage wake ctrl versus SD t1	65.56498	97.12189	group F(1, 176) = 16.535p = 7.19e-05 time F(7, 176) = 19.317p = < 2e-16 interaction F(7, 176) = 2.854p = 0.00762	-3.3921	6.9370e-04	**0.0055**
Percentage wake ctrl versus SD t2	52.8762	85.2927		-2.7816	0.0054	**0.0216**
Percentage wake ctrl versus SD t3	45.72528	73.32339		-1.3905	0.1644	0.4384
Percentage wake ctrl versus SD t4	40.85567	64.47306		-0.5214	0.6021	0.6430
Percentage wake ctrl versus SD t5	38.23295	57.31365		0.6373	0.5239	0.6430
Percentage wake ctrl versus SD t6	37.33112	53.21407		0.4635	0.6430	0.6430
Percentage wake ctrl versus SD t7	36.23554	49.08048		0.5794	0.5623	0.6430
Percentage wake ctrl versus SD t8	34.56197	46.83342		-0.4635	0.6430	0.6430
Percentage NREM ctrl versus SD t1	32.32702	2.878114	group F(1, 176) = 13.911p = 0.000258 time F(7, 176) = 17.411p = < 2e-16 interaction F(7, 176) = 3.112p = 0.004034	3.3921	6.9370e-04	**0.0055**
Percentage NREM ctrl versus SD t2	43.52957	14.46522		2.3759	0.0175	0.0700
Percentage NREM ctrl versus SD t3	49.42808	25.54202		0.9849	0.3247	0.5131
Percentage NREM ctrl versus SD t4	52.92707	33.22079		0.2897	0.7721	0.7721
Percentage NREM ctrl versus SD t5	54.94992	39.29454		-1.0429	0.2970	0.5131
Percentage NREM ctrl versus SD t6	55.50617	42.63884		-0.4635	0.6430	0.7349
Percentage NREM ctrl versus SD t7	56.29863	46.05109		-0.8690	0.3848	0.5131
Percentage NREM ctrl versus SD t8	57.56777	47.67031		0.9849	0.3247	0.5131
Percentage REM ctrl versus SD t1	2.108006	0	group F(1, 176) = 19.326p = 1.9e-05 time F(7, 176) = 18.536p = < 2e-16 interaction F(7, 176) = 1.485p = 0.175	2.7408	0.0061	**0.0245**
Percentage REM ctrl versus SD t2	3.594233	0.2420807		3.8712	1.0829e-04	**0.0009**
Percentage REM ctrl versus SD t3	4.846632	1.134588		2.5604	0.0105	**0.0279**
Percentage REM ctrl versus SD t4	6.217263	2.306146		2.0862	0.0370	0.0739
Percentage REM ctrl versus SD t5	6.817132	3.391817		0.9270	0.3539	0.5663
Percentage REM ctrl versus SD t6	7.162707	4.14709		0.4346	0.6638	0.8620
Percentage REM ctrl versus SD t7	7.465834	4.868435		0.2897	0.7721	0.8620
Percentage REM ctrl versus SD t8	7.870266	5.496274		0.1738	0.8620	0.8620
Number REM ctrl versus SD t1	1.230769	0	group F(1, 176) = 0.343p = 0.5587 time F(7, 176) = 16.971p = < 2e-16 interaction F(7, 176) = 2.302p = 0.0287	2.7483	0.0060	**0.0240**
Number REM ctrl versus SD t2	2.269231	0.3181818		3.5143	4.4086e-04	**0.0035**
Number REM ctrl versus SD t3	2.820513	1.030303		1.4618	0.1438	0.3834
Number REM ctrl versus SD t4	3.596154	1.886364		0.4982	0.6183	0.7066
Number REM ctrl versus SD t5	3.984615	2.745455		-0.2050	0.8376	0.8376
Number REM ctrl versus SD t6	4.102564	3.439394		-1.1093	0.2673	0.5125
Number REM ctrl versus SD t7	4.395604	3.961039		-0.9938	0.3203	0.5125
Number REM ctrl versus SD t8	4.663462	4.431818		-0.6484	0.5167	0.6890
Bouts duration REM ctrl versus SD t1	34.92364	0	group F(1, 176) = 52.057p = 1.54e-11 time F(7, 176) = 5.502p = 9.77e-06 interaction F(7, 176) = 1.928p = 0.0676	2.7408	0.0061	**0.0163**
Bouts duration REM ctrl versus SD t2	45.22999	6.726445		3.2847	0.0010	**0.0041**
Bouts duration REM ctrl versus SD t3	55.80633	12.21047		3.4914	4.8049e-04	**0.0038**
Bouts duration REM ctrl versus SD t4	57.47141	18.88586		2.0282	0.0425	**0.0486**
Bouts duration REM ctrl versus SD t5	57.93777	23.76751		2.2016	0.0277	**0.0427**
Bouts duration REM ctrl versus SD t6	60.86287	26.5623		2.1731	0.0298	**0.0427**
Bouts duration REM ctrl versus SD t7	60.36152	30.33543		0.7532	0.4513	0.4513
Bouts duration REM ctrl versus SD t8	60.31168	31.49703		2.1437	0.0321	**0.0427**

Table S7. Summary table of statistics related to Figure 2

Table shows descriptive statistics for each group, the statistical tests used to compare groups between each other and adjusted p-values. Each line corresponds to one panel on Figure 2.

Data sets	ctrl group					SD+mCherry+saline group					SD+mCherry+CNO group					SD+dreadd+CNO group					Two-way repeated mesures ANOVA		Wilcoxon rank sum test			adjusted p-value (Benjamini-Hochberg)
	quantile					quantile					quantile					quantile										
	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	F value	p-value	groups for comparison	zval	p-value	
Wake percentage early phase (panel F)	23.45	40.89	53.76	63.07	84.38	67.99	84.42	95.33	99.55	99.87	56.05	72.59	76.88	83.43	100.00	51.03	70.30	85.82	98.34	99.68	group F(3, 74) = 13.03 time F(1, 74) = 370.39 interaction F(3, 74) = 11.27	6.40e-07 < 2e-16 3.58e-06	ctrl vs SD+mCherry+sal :	-3.8817	1.0371e-04	**0.0006**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	-2.3242	0.0201	**0.0323**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	0.8543	0.3929	0.4852
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	-2.9548	0.0031	**0.0094**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	2.2983	0.0215	**0.0323**
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0.4523	0.6511	0.6605
Wake percentage late phase (panel K)	23.24	24.26	26.63	29.32	34.02	21.11	22.09	25.53	32.98	47.63	12.78	23.07	24.77	28.42	30.22	20.51	26.21	27.38	35.09	40.71			ctrl vs SD+mCherry+sal :	0.4635	0.6430	0.7749
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	-0.4824	0.6295	0.7749
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-0.2513	0.8016	0.8075
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	1.1587	0.2466	0.7397
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	0.4597	0.6458	0.7749
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-1.2563	0.2090	0.7397
NREM percentage early phase (panel G)	8.59	32.37	40.27	52.77	72.80	0.00	0.10	4.67	14.76	31.95	0.00	13.11	17.03	25.46	43.94	0.30	1.66	13.81	29.69	42.30	group F(3, 74) = 11.576 time F(1, 74) = 257.114 interaction F(3, 74) = 8.493	2.64e-06 < 2e-16 6.40e-05	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3.7692	1.6380e-04	**0.0010**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2.3242	0.0201	**0.0335**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1.0579	0.2901	0.3597
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	2.8968	0.0038	**0.0113**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-1.8109	0.0702	0.1052
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	0.0503	0.9599	0.9612
NREM percentage late phase (panel L)	54.01	59.87	61.91	64.63	66.66	45.19	54.60	57.49	65.32	67.22	59.53	60.39	62.88	65.60	74.28	51.57	57.97	60.81	65.09	67.19			ctrl vs SD+mCherry+sal :	1.1008	0.2710	0.6065
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	0.1316	0.8953	0.8983
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-0.8543	0.3929	0.6065
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	-0.6373	0.5239	0.6287
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-1.9043	0.0569	0.3412
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	0.9548	0.3397	0.6065
REM percentage early phase (panel H)	0.00	1.50	2.42	3.87	6.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	group F(3, 74) = 11.38 time F(1, 74) = 504.73 interaction F(3, 74) = 1.51	3.21e-06 < 2e-16 0.219	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3.7889	1.5131e-04	**0.0008**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2.8332	0.0046	**0.0041**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1.2309	0.2184	0.7059
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	3.6529	2.5929e-04	**0.0008**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0.9091	0.3633	0.5450
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0.4486	0.6537	0.7059
REM percentage late phase (panel M)	7.33	8.75	9.49	9.97	10.78	5.96	6.22	7.96	7.20	11.71	3.78	6.13	7.90	9.64	1.20	6.46	6.94	7.97	11.17	11.84			ctrl vs SD+mCherry+sal :	2.2016	0.0277	0.1662
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	0.8332	0.4047	0.5548
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1.0553	0.2913	0.5548
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	1.7960	0.0725	0.2175
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0.2627	0.7928	0.7928
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0.7538	0.4510	0.5548
REM bouts number early phase (panel I)	0.00	1.75	3.20	3.25	5.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	group F(3, 74) = 1.840 time F(1, 74) = 605.249 interaction F(3, 74) = 1.724	0.147 <2e-16 0.169	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3.8106	1.3861e-04	**0.0008**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2.8183	0.0048	**0.0072**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1.2309	0.2184	0.8471
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	3.6428	2.6968e-04	**0.0008**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0.9091	0.3633	0.5450
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0.3596	0.7192	1
REM bouts number late phase (panel N)	23.00	26.00	29.00	30.75	35.00	18.00	25.25	29.00	36.50	57.00	17.00	21.25	30.00	32.75	36.00	17.00	19.00	25.00	29.00	30.00			ctrl vs SD+mCherry+sal :	-0.3779	0.7055	0.8466
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	1.5437	0.1227	0.4079
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	1.3585	0.1743	0.4079
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	0.0291	0.9768	0.9768
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	0.7233	0.4695	0.7042
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	1.2602	0.2076	0.4079
REM bouts duration early phase (panel J)	0.00	32.45	58.53	69.59	91.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.83	0.00	0.00	0.00	0.00	20.48	group F(3, 74) = 26.25 time F(1, 74) = 158.78 interaction F(3, 74) =15.05	1.14e-11 < 2e-16 9.64e-08	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3.7889	1.5131e-04	**0.0008**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2.8332	0.0046	**0.0041**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1.2309	0.2184	0.7059
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	3.6529	2.5929e-04	**0.0008**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0.9091	0.3633	0.5450
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0.4486	0.6537	0.7059
REM bouts duration late phase (panel O)	50.03	53.33	57.32	64.40	71.37	30.41	39.61	45.60	54.72	65.86	39.31	42.49	48.82	53.54	66.93	53.25	54.42	66.81	76.63	77.11			ctrl vs SD+mCherry+sal :	2.3754	0.0175	**0.0263**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	-1.4471	0.1479	0.1821
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-2.5628	0.0104	**0.0263**
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	2.3754	0.0175	**0.0263**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0.7223	0.4701	0.4701
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-2.4623	0.0138	**0.0263**

Table S8. Summary table of statistics related to Figure 3

Table shows descriptive statistics for each group, the statistical tests used to compare groups between each other and adjusted p-values. Each line corresponds to one panel on Figure 3.

	ctrl group					SD+mCherry+saline group					SD+mCherry+CNO group					SD+dreadd+CNO group					Kruskal-Wallis test		adjusted p-value (Benjamini-Hochberg)
	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	Kruskal-Wallis chi-squared	p-value	
Short REM (<25s) percentage (panel C)	19.23	23.08	32.14	37.93	45.45	32.00	35.45	45.45	49.14	72.97	23.53	31.37	40.00	41.89	50.00	5.88	11.98	19.26	25.68	41.38	12.79	0.005	ctrl vs SD_mCherry_sal : **0.045130168** ctrl vs SD_dreadd_cno : 0.203257881 SD_mCherry_sal vs SD_dreadd_cno : **0.008916803** ctrl vs SD_mcherry_cno : 0.153975158 SD_mCherry_sal vs SD_mcherry_cno : 0.533195827 SD_dreadd_cno vs SD_mcherry_cno : **0.023874498**
REM bouts duration (no short) (panel D)	66.29	76.10	77.44	86.14	93.25	61.98	71.55	76.30	82.60	91.22	48.92	66.49	70.35	75.30	92.02	63.40	77.69	82.42	83.22	86.38	4.91	0.18	ctrl vs SD_mCherry_sal : 0.7063403 ctrl vs SD_dreadd_cno : 0.9377769 SD_mCherry_sal vs SD_dreadd_cno : 0.6126976 ctrl vs SD_mcherry_cno : 0.2617146 SD_mCherry_sal vs SD_mcherry_cno : 0.4256495 SD_dreadd_cno vs SD_mcherry_cno : 0.2647825
Peak frequency short REM bouts (panel E middle)	6.26	6.71	6.87	6.96	7.17	6.26	6.41	6.64	6.98	07.09	6.41	6.64	6.79	9.2024	7.40	6.26	6.33	6.71	6.87	6.87	2.71	0.44	ctrl vs SD_mCherry_sal : 0.6077184 ctrl vs SD_dreadd_cno : 1.0000000 SD_mCherry_sal vs SD_dreadd_cno : 0.7802384 ctrl vs SD_mcherry_cno : 0.9496161 SD_mCherry_sal vs SD_mcherry_cno : 0.4624420 SD_dreadd_cno vs SD_mcherry_cno : 0.5968369
Peak power short REM bouts (panel E right)	3.16	4.28	4.99	06.08	8.88	4.91	5.58	06.05	6.40	9.80	4.20	4.89	5.87	11.2024	6.89	4.99	5.21	5.96	6.32	6.77	2.74	0.43	ctrl vs SD_mCherry_sal : 0.7135258 ctrl vs SD_dreadd_cno : 0.9452088 SD_mCherry_sal vs SD_dreadd_cno : 0.8082845 ctrl vs SD_mcherry_cno : 0.7284745 SD_mCherry_sal vs SD_mcherry_cno : 0.6745523 SD_dreadd_cno vs SD_mcherry_cno : 0.8712424
Peak frequency long REM bouts (panel F middle)	6.94	7.13	7.25	7.32	7.40	6.79	07.02	07.09	7.15	7.55	6.71	9.2024	7.24	7.32	7.55	6.87	6.94	7.02	7.02	7.17	6.18	0.10	ctrl vs SD_mCherry_sal : 0.2600702 ctrl vs SD_dreadd_cno : 0.1762876 SD_mCherry_sal vs SD_dreadd_cno : 0.4207118 ctrl vs SD_mcherry_cno : 0.8190570 SD_mCherry_sal vs SD_mcherry_cno : 0.3502999 SD_dreadd_cno vs SD_mcherry_cno : 0.1731027
Peak power long REM bouts (panel F right)	3.12	3.94	4.44	5.13	6.68	4.35	4.53	05.03	5.24	7.26	2.25	4.28	4.59	5.17	5.51	3.70	4.43	4.63	4.64	5.41	2.43	0.49	ctrl vs SD_mCherry_sal : 0.9683061 ctrl vs SD_dreadd_cno : 1.0000000 SD_mCherry_sal vs SD_dreadd_cno : 0.6464129 ctrl vs SD_mcherry_cno : 1.0000000 SD_mCherry_sal vs SD_mcherry_cno : 0.6427982 SD_dreadd_cno vs SD_mcherry_cno : 0.9577731

Table S9. Summary table of statistics related to Figure S3 (large PFC inhibition) Table shows descriptive statistics for each group, the statistical tests used to compare groups between each other and adjusted p-values. Each line corresponds to one panel on Figure S3.

Data sets	ctrl group					SD+mCherry+saline group					SD+mCherry+CNO group					SD+dreadd+CNO group					Two-way repeated mesures ANOVA		Wilcoxon rank sum test			adjusted p-value (Benjamini-Hochberg)
	quantile					quantile					quantile					quantile										
	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	0%	25%	50%	75%	100%	F value	p-value	groups for comparison	zval	p-value	
Wake percentage early phase (panel I)	23,45	40,89	53,76	63,07	84,38	67,99	84,42	95,33	99,55	99,87	56,06	72,59	76,88	83,44	100,00	29,42	44,80	55,79	74,68	81,55	Group: F(3,72) = 12,27 Time : F(1,72) = 299,71 Interaction(3,72) = 12,92	1,43e-06 < 2e-16 7,68e-07	ctrl vs SD+mCherry+sal :	-3,8817	0,00	**0.0006**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	-0,30	0,77	0.7674
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	2,7189	0,01	**0.0131**
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	-2,95	0,00	**0.0094**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	2,2983	0,02	**0.0323**
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	1,9259	0,05	0.0649
Wake percentage late phase (panel N)	23,24	24,26	26,63	29,32	34,03	21,11	22,09	25,53	32,99	47,63	12,7765	23,07	24,77	28,42	30,22	18,13	24,03	31,84	36,45	50,15			ctrl vs SD+mCherry+sal :	0,46	0,64	0.6458
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	-0,89	0,38	0.6458
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-0,57	0,57	0.6458
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	1,1587	0,25	0.6458
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	0,46	0,65	0.6458
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-1,59	0,11	0.6458
NREM percentage early phase (panel J)	8,5944	32,37	40,27	52,78	72,80	0,00	0,11	4,6667	14,76	31,96	0,00	13,11	17,03	25,46	43,94	17,98	25,0208	41,49	51,18	70,44	Group: F(3,72) = 10,60 Time : F(1,72) = 183,97 Interaction(3,72) = 11,64	7,41e-06 < 2e-16 2,65e-06	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3,7692	0,00	**0.0010**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	0,0986	0,92	0.9215
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-2,73	0,01	**0.0128**
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	2,8968	0,00	**0.0113**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-1,81	0,07	0.0842
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-2,1525	0,03	**0.0470**
NREM percentage late phase (panel O)	54,01	59,87	61,91	64,63	66,66	45,19	54,60	57,49	65,32	67,22	59,53	60,40	62,89	65,60	74,28	38,74	44,74	48,06	58,75	66,88			ctrl vs SD+mCherry+sal :	1,1008	0,27	0.3252
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	1,6757	0,09	0.1876
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	1,2462	0,21	0.3191
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	-0,64	0,52	0.5239
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-1,90	0,06	0.1706
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	2,0392	0,0414	0.1706
REM percentage early phase (panel K)	0,00	1,5029	2,4199	3,8661	6,2071	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,60	2,4007	Group: F(3,72) = 17,486 Time : F(1,72) = 407,607 Interaction(3,72) = 4,429	1,25e-08 < 2e-16 0,00649	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3,7889	0,00	**0.0008**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2,2089	0,03	0.0544
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1,35	0,18	0.2663
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	3,6529	0,00	**0.0008**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0,91	0,36	0.4360
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0,5908	0,55	0.5546
REM percentage late phase (panel P)	7,3299	8,7518	9,4884	9,9699	10,7769	5,9579	6,2211	7,0964	9,0758	11,7122	3,7807	6,1345	7,9041	9,6402	10,0157	2,2176	2,302	4,0649	6,408	7,1036			ctrl vs SD+mCherry+sal :	2,2016	0,03	**0.0470**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	3,1543	0,00	**0.0097**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	2,1525	0,03	**0.0470**
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	1,796	0,07	0.0870
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0,2627	0,7928	0.7928
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	2,1525	0,0314	**0.0470**
REM bouts number early phase (panel L)	0,00	1,75	3,2	3,25	5,2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,25	1	Group: F(3,72) = 3,694 Time : F(1,72) = 596,637 Interaction(3,72) = 3,292	0,0156 <2e-16 0,0254	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3,8106	1,39E-04	**0.0008**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2,5924	0,0095	**0.0191**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1,3484	0,1775	0.2663
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	3,6428	2,70E-04	**0.0008**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0,9091	0,3633	0.4360
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0,4935	0,6217	0.6217
REM bouts number late phase (panel Q)	23,00	26,00	29,00	30,75	35,00	18,00	25,25	29,00	36,50	57,00	17,00	21,25	30,00	32,75	36,00	17,00	17,75	20,00	22,25	23,00			ctrl vs SD+mCherry+sal :	-0,3779	0,7055	0.8466
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	3,1131	0,0019	**0.0111**
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	2,3826	0,0172	0.0516
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	0,0291	0,9768	0.9768
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	0,7233	0,4695	0.7042
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	1,9302	0,0536	0.1072
REM bouts duration early phase (panel M)	0,00	32,45	58,53	69,59	91,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,83	0,00	0,00	0,00	32,41	129,64	Group: F(3,72) = 12,645 Time : F(1,72) = 50,074 Interaction(3,72) = 6,092	9,95e-07 7,99e-10 0,00094	ctrl vs SD+mCherry+sal :	3,7889	1,51E-04	**0.0008**
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	1,506	0,1321	0.2641
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	-1,3484	0,1775	0.2663
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	3,6529	2,59E-04	**0.0008**
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0,9091	0,3633	0.4360
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	-0,5908	0,5546	0.5546
REM bouts duration late phase (panel R)	50,03	53,33	57,32	64,40	71,37	30,42	39,61	45,60	54,72	65,86	39,31	42,50	48,82	53,54	66,93	18,26	23,19	40,92	52,58	64,36			ctrl vs SD+mCherry+sal :	2,3754	0,0175	0.0526
																							ctrl vs SD+dreadd+cno :	2,1686	0,0301	0.0602
																							SD+mCherry+sal vs SD+dreadd+cno :	0,6797	0,4967	0.4967
																							ctrl vs SD+mCherry+cno :	2,3754	0,0175	0.0526
																							SD+mCherry+sal vs SD+mCherry+cno :	-0,7223	0,4701	0.4967
																							SD+mCherry+cno vs SD+dreadd+cno :	1,1329	0,2573	0.3859

Chapitre 5 : Le rôle des neurones du VLPO exprimant la corticolibérine (CRH) dans la régulation du sommeil paradoxal

Comme je l'ai présenté en introduction, le VLPO est une petite structure hypothalamique qui a initialement été décrite comme un cluster de neurones co-exprimant le GABA et le neuropeptide Gal. Ces neurones favorisent le sommeil via leurs projections sur les structures responsables de l'éveil, notamment le TMN. Plus récemment, des études ont mis en évidence que le VLPO contient un plus large éventail de populations neurales qui ont été identifiées parmi ces neurones GABA projetant au TMN (Chung et al., 2017). Ces populations expriment différents peptides pouvant servir de marqueurs fiables pour les cibler plus spécifiquement. Parmi eux, on retrouve la CCK, la TAC1, le CRH, la substance P ou encore la dynorphine A (Chung et al., 2017 ; Moffitt et al., 2018). Le rôle de ces peptides au sein du VLPO n'est pas connu. De plus, bien que ces nouvelles populations semblent chevaucher, au moins en partie, la population classique de neurones promoteurs de sommeil du VLPO, il n'est pas clair si l'expression différentielle, d'un ou plusieurs de ces nouveaux peptides signe une spécificité quant à leur rôle dans la régulation du sommeil.

Dans cette partie de ma thèse, je me suis donc intéressée aux neurones exprimant le peptide CRH. On sait que les neuropeptides jouent un rôle important dans la régulation des comportements et, comme je l'ai mentionné dans l'introduction, le CRH est un peptide connu pour son rôle de médiateur de la réponse au stress (voir Chapitre 2). Bien que le rôle du peptide CRH au sein du VLPO ne soit pas documenté (et que ça n'ait pas été un objectif immédiat au cours de cette thèse), nous avons pensé qu'elle constituait une bonne population candidate pour médier les effets du stress sur le sommeil. L'objectif de ces travaux est donc de préciser le rôle des neurones exprimant le peptide CRH du VLPO (que je noterai $VLPO^{CRH}$) dans la régulation du sommeil. Un second objectif, à plus long terme, est de savoir si les neurones $VLPO^{CRH}$ pourraient constituer les effecteurs neuronaux des résultats obtenus dans le Chapitre 4. Autrement dit, si les projections corticales pourraient cibler plus spécifiquement cette population afin d'induire la fragmentation du sommeil paradoxal que nous avons mis en évidence au cours de ma thèse.

Pour ce faire, nous avons eu recours à des manipulations chémogénétiques (activation et inhibition) des neurones VLPO^{CRH}. Nous avons pu spécifiquement cibler les neurones CRH grâce à l'utilisation d'une lignée de souris transgéniques CRH-Cre. Ces manipulations ont été associées à des enregistrements électrophysiologiques chez des souris vigiles afin de pouvoir évaluer leurs impacts sur l'architecture du sommeil. Pour plus de détails concernant les méthodes utilisées, le lecteur pourra se référer au Chapitre 4.

RÉSULTATS

L'activation chémogénétique des neurones VLPO^{CRH} induit une suppression du sommeil paradoxal

Le rôle des neurones VLPO^{CRH} dans la régulation du sommeil n'a été que peu documenté. Afin d'étudier leur implication dans la régulation des états de sommeil, et en particulier, de savoir si cette population joue le même rôle que les neurones promoteurs de sommeil classiques du VLPO, nous avons réalisé des manipulations spécifiques des neurones VLPO^{CRH} par des techniques de chémogénétique.

Tout d'abord, nous avons réalisé des activations spécifiques des neurones VLPO^{CRH} grâce à l'expression de récepteurs DREADDs excitateurs (pour *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*). Pour ce faire, nous avons utilisé des vecteurs viraux dont l'expression est dépendante de la Cre chez une lignée de souris transgéniques CRH-Cre (**Fig. 5.1A,B**). Les souris ont été implantées avec des électrodes intra-cérébrales afin d'enregistrer les potentiels de champs locaux dans le bulbe olfactif (OB), le PFC et l'HPC. Ces signaux ont permis de monitorer les états de vigilance au cours de la session de sommeil (**Fig. 5.1A**). Chaque souris (n = 13) a été enregistrée dans deux conditions selon un ordre aléatoire : une condition contrôle dans laquelle elle reçoit une injection de saline et une condition expérimentale dans laquelle elle reçoit une injection de clozapine N-oxide (CNO), un agoniste des récepteurs DREADDs, permettant *in fine* d'activer les neurones VLPO^{CRH}.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'architecture éveil-sommeil globale grâce aux hypnogrammes individuels de chaque souris (**Fig. 5.1C**). De manière frappante, nous avons observé que, suite à l'injection de CNO, les souris présentaient une forte diminution, voire une disparition, des périodes de sommeil paradoxal par rapport à la condition contrôle avec une injection de saline. Cette disparition s'est atténuée avec le temps, avec un retour de quelques épisodes de sommeil paradoxal ponctuels en fin d'enregistrement. Ces observations ont été confirmées par des quantifications réalisées au cours de l'enregistrement en effectuant des moyennes par fenêtres temporelles d'une heure (**Fig. 5.1H-J**, à gauche) ainsi qu'en moyenne sur l'ensemble de la période post-injection de saline et de CNO (**Fig. 5.1H-J**, à droite). En effet, nous avons observé une forte diminution du pourcentage de sommeil paradoxal dans la condition CNO par rapport à saline (signed rank value = 91, p = 2.4414e-04) (**Fig. 5.1J**).

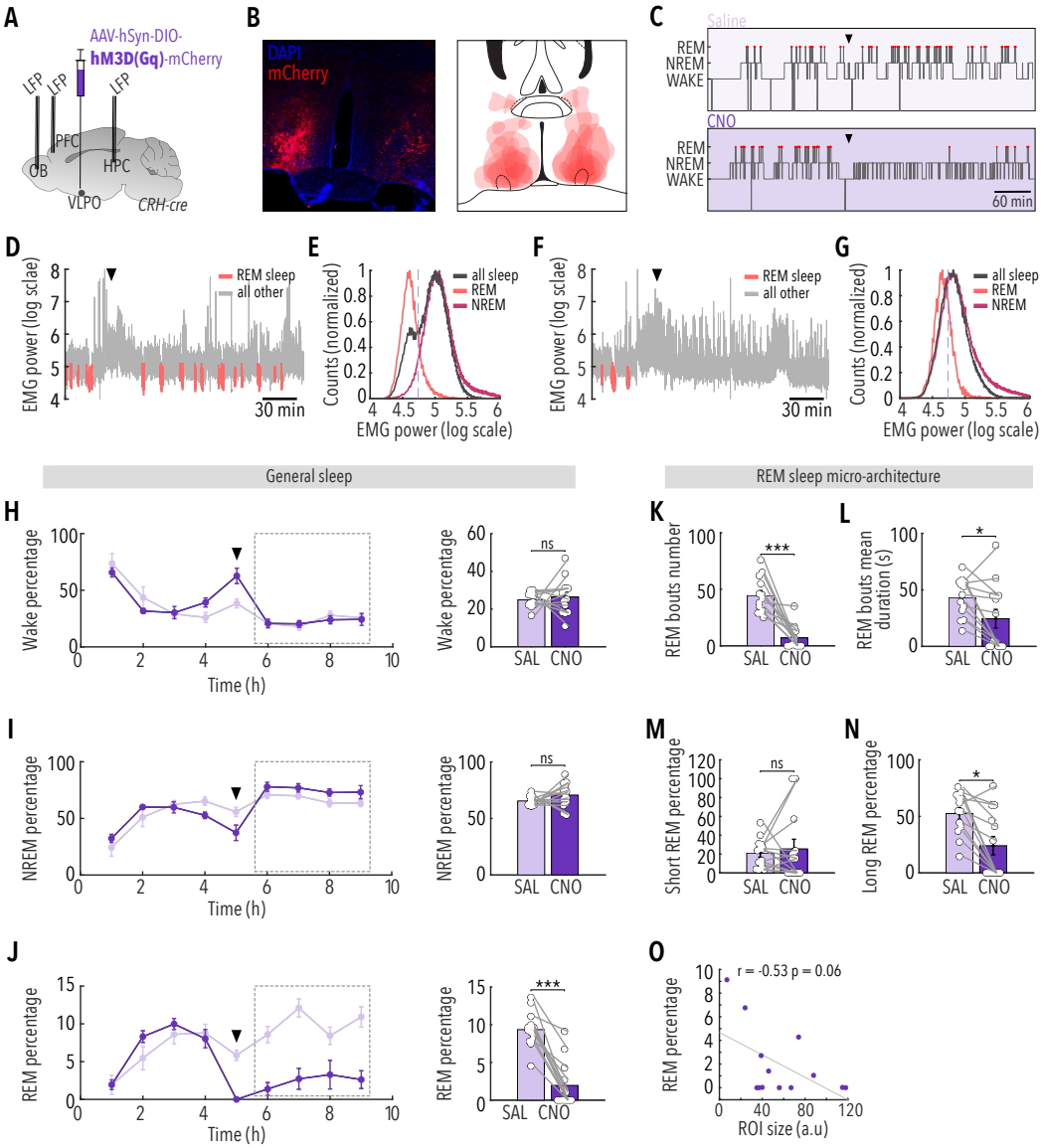


Figure 5.1. L'activation chémogénétique des neurones VLPO^{CRH} induit une suppression du sommeil paradoxal

A. Schéma illustrant l'injection virale, permettant l'expression sélective des récepteurs DREADDs excitateurs dans les neurones VLPO^{CRH}, ainsi que les sites d'implantation d'électrodes intra-cérébrales dans le OB, PFC et HPC. **B.** Gauche : exemple représentatif d'une image par épifluorescence illustrant la localisation du site d'injection au niveau du VLPO (barre d'échelle, ?). Droite : Reconstruction du site d'injection de la construction virale pour l'ensemble des souris (n=13). **C.** Exemples représentatifs d'hypnogrammes pendant la session de sommeil mettant en évidence la suppression du sommeil paradoxal suite à l'activation des neurones VLPO^{CRH} par injection de CNO (en bas) par rapport à une souris contrôle recevant une injection de saline (en haut). **D.** Tracé de l'EMG en échelle logarithmique pour une souris contrôle recevant une injection de saline (signalée par une flèche). Les périodes de sommeil paradoxal sont représentées en rouge. **E.** Distribution des valeurs de l'EMG (échelle logarithmique) pour la totalité du sommeil (gris), le sommeil paradoxal (rouge) et le sommeil lent (violet) pour une souris contrôle recevant une injection de saline. **F.** Comme pour D. mais pour la même souris recevant une injection de CNO.

Noter la disparition des périodes de sommeil paradoxal dans la période suivant l'injection de CNO (signalée par une flèche). **G.** Comme pour E. mais pour une souris recevant une injection de CNO. Noter que le pic correspondant au sommeil paradoxal a disparu et, par conséquent, l'ensemble des distributions se chevauche. **H.** Gauche : pourcentage moyen d'éveil au cours de la session de sommeil pour les souris contrôles recevant une injection de saline (violet clair) et les souris recevant une injection de CNO (violet foncé). L'injection est représentée par une flèche. Droite : pourcentage moyen d'éveil pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO. **I.** Comme pour H. mais pour le sommeil lent. **J.** Comme pour H. mais pour le sommeil paradoxal. **K-N.** Nombre moyen d'épisodes de sommeil paradoxal (**K**), durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal (**L**), pourcentage moyen d'épisodes de sommeil paradoxal inférieurs à 20 secondes (**M**), pourcentage moyen d'épisodes de sommeil paradoxal supérieurs à 20 secondes (**N**) pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO. **O.** Corrélation entre le pourcentage de sommeil paradoxal et la taille de la région contenant des neurones marqués par le virus. **H-N** : Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM pour les groupes saline (violet clair, n = 13) et CNO (violet foncé, n = 13). La significativité statistique a été déterminée à l'aide du test des rangs signés de Wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Par ailleurs, le pourcentage de sommeil paradoxal observé suite à l'injection de CNO a montré une forte tendance à la corrélation avec la taille de la région contenant des neurones marqués par la construction virale permettant l'expression des récepteurs DREADDs excitateurs ($r = -0.53$, $p = 0.06$) (**Fig. 5.1O**).

La suppression du sommeil paradoxal observée suite à l'activation des neurones $VLPO^{CRH}$ par injection de CNO s'est traduite par une forte diminution du nombre d'épisodes (signed rank value = 91, p = 2.4414e-04) (**Fig. 5.1K**) et une diminution de la durée moyenne des épisodes (signed rank value = 79, p = 0.0171) (**Fig. 5.1**L) par rapport à la condition saline. Plus précisément, l'activation des neurones $VLPO^{CRH}$ a empêché la mise en place de périodes de sommeil paradoxal consolidées, comme l'indique la diminution du pourcentage d'épisodes de sommeil paradoxal longs (>20 s ; calculé comme : nombre d'épisodes longs / nombre d'épisodes total *100) (signed rank value = 86, p = 0.0024) (**Fig. 5.1N**). Aucune modification de l'occurrence des épisodes de sommeil paradoxal courts (<20 s) n'a été observée (signed rank value = 45, p = 0.9863) (**Fig. 5.1M**).

De manière intéressante, nous avons pu identifier deux sous-groupes de souris : un groupe pour lequel les périodes de sommeil paradoxal étaient totalement abolies suite à l'injection de CNO (par rapport à l'injection de saline) et un groupe qui présentait une diminution plus modérée (**Fig. 5.1J-L,N**). Cette dissociation était particulièrement visible pour le pourcentage d'épisodes de sommeil paradoxal consolidés/longs (**Fig. 5.1N**). Nous avons alors calculé le

changement absolu du pourcentage d'épisodes de sommeil paradoxal consolidés/longs (changement = pourcentage d'épisodes longs en condition CNO - pourcentage d'épisodes longs en condition saline) en fonction de l'étendue de la région contenant des neurones labellisés par le fluorophore mCherry (notée ROI pour *region of interest*) (**Fig. 5.2C**). Bien que la corrélation entre ces deux facteurs ne soit pas significative (r = -0.1045, p = 0.7341), nous avons pu visuellement identifier ces deux sous-groupes et mettre en évidence que la dissociation des effets observés peut s'expliquer par le marquage (ou l'absence de marquage) du VLPO par le virus. En d'autres termes, les souris présentant une suppression du sommeil paradoxal sont celles dont le VLPO est entièrement marqué par le virus ; alors que celles présentant une diminution plus modérée n'ont montré que très peu voire aucun marquage au niveau du VLPO (**Fig. 5.2A-B**).

Ensemble, ces résultats renforcent la spécificité des neurones VLPO^{CRH} dans la régulation du sommeil paradoxal.

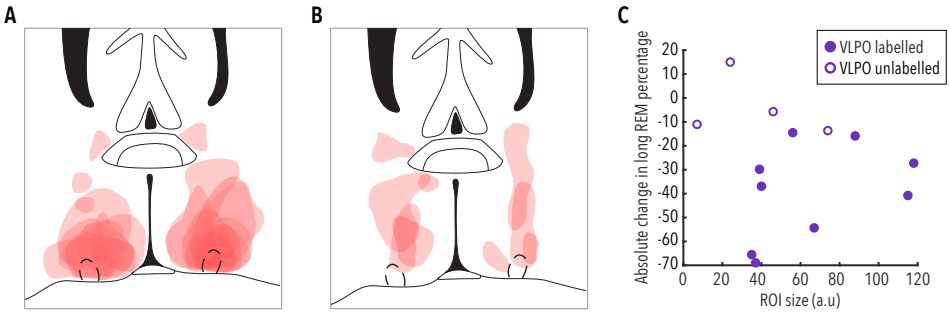


Figure 5.2. Analyse histologique en fonction des effets sur le sommeil paradoxal
A. Reconstruction du site d'injection de la construction virale pour le sous-groupe de souris montrant une forte diminution du pourcentage de sommeil paradoxal (n=9). **B.** Reconstruction du site d'injection de la construction virale pour le sous-groupe de souris montrant une faible diminution (voire pas de changement) du pourcentage de sommeil paradoxal (n=4). **C.** Corrélation entre le changement absolu du pourcentage d'épisodes de sommeil paradoxal supérieurs à 20 secondes avec la taille de la région contenant des neurones marqués par le virus.

L'ensemble des classifications des états de vigilance est effectué grâce à des électrodes intracérébrales. En ce qui concerne le sommeil paradoxal, il est identifié par la mesure du ratio de puissances thêta/delta dans l'hippocampe, autrement dit la puissance des oscillations thêta de l'hippocampe est un critère clé dans l'identification du REM.

Dans certains cas, suite à l'activation chémogénétique des neurones VLPO^{CRH}, nous avons observé une suppression totale du sommeil paradoxal chez 8 des 13 souris (**Fig. 5.1J**). Ces résultats ont soulevé une question méthodologique : cette disparition du sommeil paradoxal pourrait être due à un problème de détection des oscillations thêta ou bien à une réelle disparition de sommeil paradoxal. Afin de confirmer nos résultats avec une seconde méthode plus classiquement utilisée, nous avons analysé les tracés EMG. Bien qu'une diminution de la puissance de l'EMG puisse être observée en moyenne sur l'ensemble des souris pendant le sommeil paradoxal en condition basale, l'identification des épisodes individuels n'a pu être effectuée qu'avec un EMG de bonne qualité. En effet, la variation de la puissance EMG entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal étant relativement faible, il est difficile de les dissocier sur l'unique base de l'EMG.

Ainsi, pour les souris ayant un EMG de bonne qualité, nous avons observé qu'en condition saline, chaque épisode de sommeil paradoxal individuel est caractérisé par une diminution du tracé EMG. Ceci était particulièrement visible grâce au tracé EMG en échelle logarithmique (**Fig. 5.1D**). De plus, lorsque l'on regarde la distribution des valeurs de l'EMG pendant le sommeil (**Fig. 5.1E**, gris foncé), on peut clairement identifier deux pics correspondant au sommeil paradoxal et au sommeil lent (**Fig. 5.1E**, rouge et violet, respectivement). Ces deux pics sont aisément dissociables en plaçant un seuil permettant ainsi d'identifier le sommeil paradoxal. En revanche, suite à l'injection de CNO, les périodes avec une diminution du tracé EMG au cours du temps ne sont plus identifiables (**Fig. 5.1F**). De même, la distribution des valeurs de l'EMG n'est plus constituée de deux pics bien dissociables, mais d'un unique pic (**Fig. 5.1G**).
L'ensemble de ces résultats confirment, à l'aide d'une méthode classique d'identification du sommeil paradoxal qu'est l'EMG, que l'activation des neurones VLPO^{CRH} induit une suppression sélective du sommeil paradoxal.

Concernant les autres états de vigilance, nous n'avons observé aucune différence ni pour les quantités globales de sommeil lent (signed rank value = 26, p = 0.1909) (**Fig. 5.1I**) ni pour celles d'éveil (signed rank value = 43, p = 0.8926) (**Fig. 5.1H**). En revanche, nous avons observé une augmentation de la durée moyenne des épisodes de sommeil lent après injection de CNO par rapport à la condition saline (signed rank value = 10, p = 0.0105) (**Fig. 5.3B**), associée à une tendance à la diminution du nombre d'épisodes de sommeil lent (signed rank

value = 72.5, p = 0.0598) (**Fig. 5.3A**). À l'inverse, pour l'éveil, nous avons observé une tendance à la diminution de la durée d'épisodes d'éveil dans la condition CNO par rapport à la condition contrôle saline (signed rank value = 73, p = 0.0574) (**Fig. 5.3D**), associée à une augmentation du nombre d'épisodes d'éveil (signed rank value = 3, p = 0.0024) (**Fig. 5.3C**).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activation des neurones VLPO^{CRH} semble fragiliser les périodes d'éveil et consolider les périodes de sommeil lent, ce qui est en accord avec le rôle des neurones promoteurs de sommeil du VLPO.

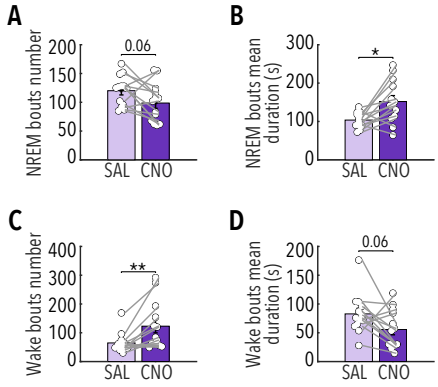


Figure 5.3. L'activation chémogénétique des neurones VLPO^{CRH} consolide les périodes de sommeil lent et fragilise l'éveil
A-B. Nombre moyen (**A**) et durée moyenne des épisodes de sommeil lent (**B**) pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO. **C-D.** Nombre moyen (**C**) et durée moyenne des épisodes d'éveil (**D**) pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO.

L'inhibition chémogénétique des neurones VLPO^{CRH} n'a aucun effet sur l'architecture du sommeil

Afin d'évaluer si les neurones VLPO^{CRH} sont nécessaires à la suppression du sommeil paradoxal observée précédemment, nous avons effectué des inhibitions spécifiques de cette population. Pour ce faire, nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment, à l'exception du virus utilisé qui, dans ce cas, permettait l'expression sélective des récepteurs DREADDs inhibiteurs dans les neurones VLPO^{CRH} (**Fig. 5.4A**).

L'inhibition des ces neurones par injection de CNO ne semble pas induire de modification de l'architecture veille-sommeil globale par rapport à la condition contrôle avec injection de saline (**Fig. 5.4B**). Les quantifications réalisées au cours de l'enregistrement en effectuant des

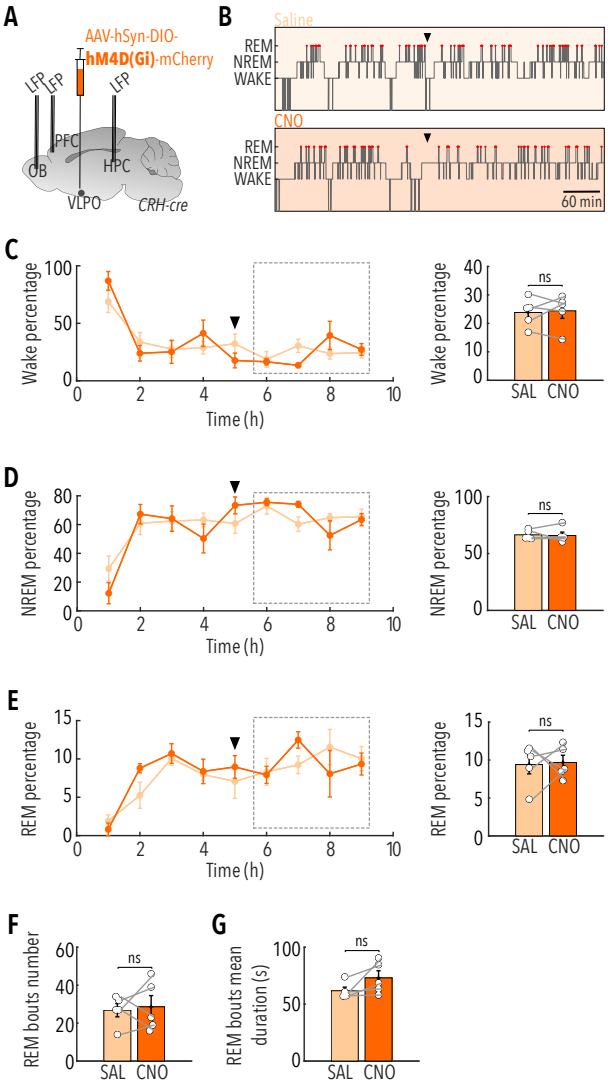


Figure 5.4. L'inhibition chémogénétique des neurones VLPO^{CRH} n'a aucun effet sur l'architecture du sommeil

A. Schéma illustrant l'injection virale, permettant l'expression sélective des récepteurs DREADDs inhibiteurs dans les neurones VLPO^{CRH}, ainsi que les sites d'implantation d'électrodes intra-cérébrales dans le OB, PFC et HPC. **B.** Exemples représentatifs d'hypnogrammes pendant la session de sommeil suite à l'inhibition des neurones VLPO^{CRH} par injection de CNO (en bas) par rapport à une souris contrôle recevant une injection de saline (en haut). **C.** Gauche : pourcentage moyen d'éveil au cours de la session de sommeil pour les souris contrôles recevant une injection de saline (orange clair) et les souris recevant une injection de CNO (orange foncé). L'injection est représentée par une flèche. Droite : pourcentage moyen d'éveil pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO. **D.** Comme pour C. mais pour le sommeil lent. **E.** Comme pour C. mais pour le sommeil paradoxal. **F.** Nombre moyen d'épisodes de sommeil paradoxal pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO. **G.** Durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal pendant la période post-injection pour les souris saline et CNO. C-G : Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM pour les groupes saline (orange clair, n = 5) et CNO (orange foncé, n = 5). La significativité statistique a été déterminée à l'aide du test des rangs signés de Wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

moyennes par fenêtres temporelles d'une heure (**Fig. 5.4C-E**, gauche) ainsi qu'en moyenne sur l'ensemble de la période post-injection de saline et de CNO (**Fig. 5.4C-E**, droite) ont confirmé ces observations. En effet, nous n'avons pas observé de différence dans les pourcentages d'éveil (signed rank value = 6, p = 0.8125) (**Fig. 5.4C**), de sommeil lent (signed rank value = 5, p = 0.6250) (**Fig. 5.4D**), ni de sommeil paradoxal (signed rank value = 7, p = 1) (**Fig. 5.4E**) entre les conditions saline et CNO.

L'analyse plus détaillée de la microarchitecture du sommeil paradoxal n'a pas révélé d'effet de l'inhibition des neurones VLPO^{CRH} sur le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal entre les conditions saline et CNO (signed rank value = 7, p = 1) (**Fig. 5.4F**). Toutefois, bien que non significative, une tendance à l'augmentation de la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal a été observée dans la condition CNO en comparaison à la condition saline (signed rank value = 0, p = 0.0625) (**Fig. 5.4G**).

Ces résultats montrent que l'inhibition des neurones VLPO^{CRH} n'a pas d'effet sur l'architecture du sommeil et suggèrent que ces neurones ne sont probablement pas actifs en conditions basales. Par conséquent, leur inhibition n'a pas d'effet sur la régulation du sommeil, en particulier du sommeil paradoxal, dans ces conditions.

Les neurones VLPO^{CRH} reçoivent des afférences monosynaptiques excitatrices du PFC

Nous avons précédemment montré que les neurones du VLPO reçoivent des afférences monosynaptiques et principalement excitatrices du PFC (voir Chapitre 4). Nous avons alors cherché à savoir si les neurones VLPO^{CRH} étaient plus particulièrement ciblés par le PFC.

Nous avons réalisé des enregistrements en *patch-clamp* des neurones VLPO^{CRH} sur des tranches de cerveau de souris CRH-Cre, précédemment injectées avec un virus Cre-dépendant, permettant l'expression spécifique du fluorophore mCherry dans les neurones exprimant le CRH (**Fig. 5.5A**). De cette manière, les neurones VLPO^{CRH} étaient facilement identifiables. Nous avons donc pu enregistrer leur réponse suite à l'activation optogénétique des afférences corticales dans la région du VLPO grâce à l'expression de la ChannelRhodopsin2, rendue possible suite à l'injection sur ces mêmes souris d'un virus antérograde dans le PFC (**Fig. 5.5A**).

La solution d'enregistrement intracellulaire a été dépourvue d'ions chlorure pour régler le potentiel d'équilibre du chlorure (E_{Cl}) à environ de -90 mV, facilitant ainsi la distinction entre les courants GABAergiques sortant et glutamatergiques entrant lors d'enregistrements en

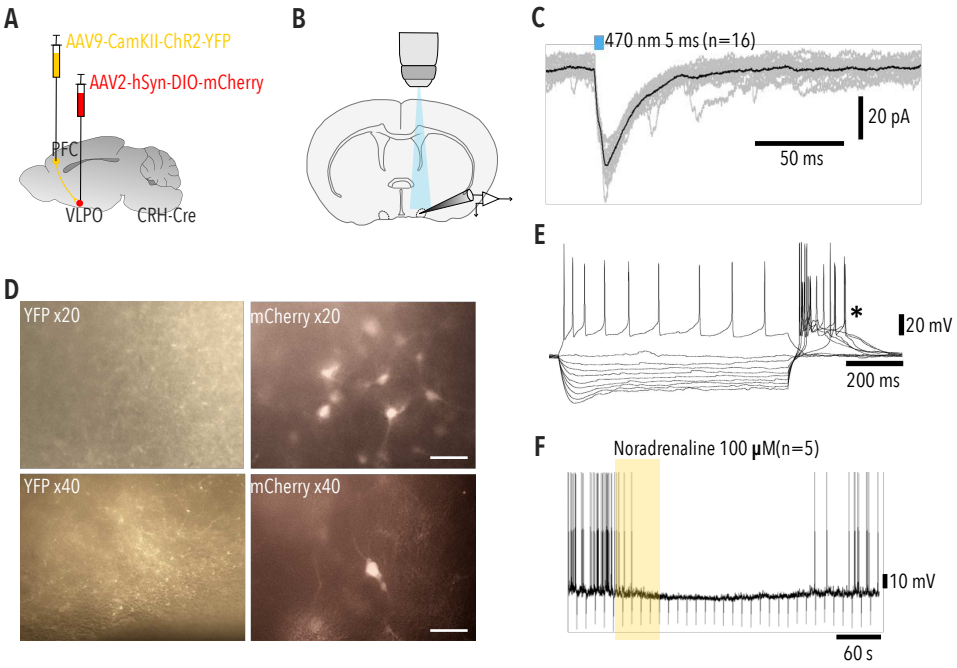


Figure 5.5. Les neurones VLPO^{CRH} reçoivent des afférences monosynaptiques excitatrices du PFC

A. Schéma illustrant les injections virales. Un virus antérograde permettant l'expression de la ChannelRhodopsin2 a été injecté dans le PFC. Un second virus, permettant l'expression sélective du fluorophore mCherry (grâce au système Cre-lox), a été injecté dans le VLPO. **B.** Schéma du mode d'enregistrement en *patch-clamp* sur une coupe coronale de cerveau. Les pulses de lumière (470 nm, 20 Hz) sont délivrés au niveau du VLPO afin d'activer spécifiquement les terminaisons axonales en provenance du PFC. **C.** L'activation optogénétique des afférences corticales au niveau du VLPO induit des courants entrants post-synaptiques excitateurs (EPSC) dans les neurones VLPO^{CRH}. **D.** Exemples représentatifs de neurones VLPO^{CRH} identifiables par le marquage mCherry qui reçoivent des afférences du PFC dont les fibres sont identifiables par le marquage YFP (échelles, 100 µm en haut et 50 µm en bas). **E.** Exemple des propriétés de décharges d'un neurone VLPO^{CRH} enregistré répondant par un EPSC suite à la stimulation des afférences du PFC. **F.** Hyperpolarisation induite par l'application de noradrénaline du neurone en E et C, caractéristique des neurones promoteurs de sommeil.

mode voltage-clamp à -60 mV. Lors de l'activation optogénétique, la totalité des neurones enregistrés (n=16) présentaient des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) entrants en réponse à la stimulation optogénétique des fibres du PFC (**Fig. 5.5C**). Nous avons également démontré que ces courants étaient de nature glutamatergique, car ils étaient bloqués par l'antagoniste kynurénate (1 mM). De plus, ils étaient de nature monosynaptique puisqu'ils persistaient dans des conditions de découplage synaptique avec l'application de TTX (1 μM) / 4 AP (100 μM).

La caractérisation des neurones répondant à la stimulation optogénétique par un EPSC a été réalisée par la suite en courant imposé. Nous avons ainsi identifié que ces neurones présentaient majoritairement un LTS (**Fig. 5.5E**) et étaient hyperpolarisés par l'application de noradrénaline (n = 5) (**Fig. 5.5F**). Ces deux caractéristiques combinées (présence d'un LTS et inhibition induite par la NA) sont typiquement associées aux propriétés de neurones promoteurs de sommeil du VLPO.

L'ensemble de ces résultats confirment que les neurones $VLPO^{CRH}$ correspondent à la population classique de neurones promoteurs de sommeil du VLPO et qu'ils sont spécifiquement ciblés par des projections excitatrices en provenance du PFC.

DISCUSSION

De plus en plus d'études s'intéressent à la POA, au sein de laquelle a été identifiée une large hétérogénéité de sous-populations dont le rôle respectif dans la régulation des états de vigilance n'est pas bien connu. Ici, nous nous sommes intéressés aux neurones exprimant le peptide CRH dans le VLPO. Nos résultats montrent que l'activation chémogénétique de ces neurones induit une suppression du sommeil paradoxal, qui dure plusieurs heures (jusqu'à 4 h), avant que quelques épisodes ponctuels ne réapparaissent. De manière intéressante, nous montrons que cette forte diminution de sommeil paradoxal est sélective des neurones $VLPO^{CRH}$ puisque cet effet est atténué chez des souris dont le VLPO n'a pas, ou peu, été transfecté par le virus permettant l'expression des récepteurs DREADDs excitateurs. De plus, nous avons montré que l'inhibition chémogénétique des neurones $VLPO^{CRH}$ n'a aucun effet en condition basale, suggérant que ces neurones ne sont pas spontanément actifs au cours du cycle-veille sommeil. Enfin, nos expériences *ex vivo* ont permis de mettre en évidence que les neurones CRH reçoivent des afférences monosynaptiques excitatrices du PFC.

Nos résultats diffèrent de ceux observés dans la première étude ayant mis en évidence la sous-population de neurones CRH parmi les neurones GABA de la POA qui projettent au TMN (Chung et al., 2017). En effet, les auteurs montrent que leur activation optogénétique favorise le sommeil lent. À l'inverse, l'inhibition chémogénétique de ces mêmes neurones induit une diminution de sommeil lent et paradoxal au profit d'une augmentation de l'éveil (Chung et al., 2017). Ces différences pourraient s'expliquer par l'utilisation de techniques de manipulations neuronales différentes. En effet, l'optogénétique est une technique permettant d'entraîner de manière rythmique les neurones ciblés et dont les effets peuvent dépendre de la fréquence de stimulation. Par exemple, il a été montré que l'activation optogénétique des neurones Gal du VLPO à basse fréquence (1-4 Hz) induit du sommeil lent ; tandis que la stimulation des mêmes neurones à plus haute fréquence (>8 Hz) induit de l'éveil (Kroeger et al., 2018). Comme proposé dans cette étude, la stimulation optogénétique à haute fréquence sature l'émission des potentiels d'action et, par conséquent, elle pourrait avoir un effet inhibiteur. À l'inverse, l'activation chémogénétique rend les neurones globalement plus sensibles aux potentielles entrées naturelles (Kroeger et al., 2018). De plus, les volumes de virus injectés par Chung et al. sont quatre fois supérieurs au volume que nous avons utilisé, il est donc possible qu'ils manipulent une plus large population neuronale dont l'activité surpasse celle de la région plus restreinte du VLPO que nous avons ciblée.

Toutefois, l'analyse histologique de l'étendue des sites d'injections virales n'est pas montrée dans l'étude de Chung et al.

Par ailleurs, nos expériences d'activation chémogénétique des neurones VLPO^{CRH} ont mis en évidence une diminution drastique des quantités de sommeil paradoxal. Cet effet semble principalement être la conséquence directe et spécifique des neurones VLPO^{CRH} puisque les souris n'ayant aucun neurone CRH transfecté au niveau du VLPO ne montrent pas une diminution de sommeil paradoxal aussi importante. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études ayant montré que l'activation chémogénétique des neurones Gal du VLPO induit une augmentation de sommeil lent et une suppression de sommeil paradoxal (Kroeger et al., 2018). Toutefois, dans nos expériences d'activation chémogénétique, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation des quantités de sommeil lent au cours de la période post injection ; en revanche, nous avons montré que le sommeil lent semble plus consolidé, avec notamment une augmentation de la durée des épisodes.

En outre, une étude s'est intéressée à la population TAC1 qui avait été identifiée parmi les neurones GABA de la POA qui projettent au TMN (Chung et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'activation chémogénétique des neurones TAC1 de la POA stabilise et consolide l'éveil (Reitz et al., 2021). Ces résultats ne corroborent pas le rôle promoteur de sommeil lent des neurones qui avait initialement été identifié (Chung et al., 2017). Toutefois, comme mentionné précédemment, les méthodes de manipulations neuronales diffèrent entre ces deux études et pourraient expliquer ces différences.

Nous avons également montré que les neurones VLPO^{CRH} possèdent les propriétés classiquement associées aux neurones promoteurs de sommeil (Gallopin et al., 2000 ; 2005). En effet, nous avons montré qu'ils possèdent un LTS et sont inhibés par la NA. On sait par ailleurs que les neurones promoteurs de sommeil du VLPO inhibent les centres responsables de l'éveil, mais également qu'ils envoient des projections vers l'hypothalamus latéral (Luppi et al., 1995 ; Sherin et al., 1998 ; Gervasoni et al., 2000 ; Steininger et al., 2001 ; Lee et al., 2005 ; Uschakov et al., 2006 ; Suntsova et al., 2007 ; Fort et al., 2009). Une hypothèse serait que les neurones VLPO^{CRH} pourraient inhiber les neurones MCH de l'hypothalamus latéral actifs pendant le sommeil paradoxal (Cvetkovic et al., 2003) permettant ainsi de lever l'inhibition exercée sur la vlPAG (Luppi et al., 2012) conduisant ainsi à la suppression du sommeil paradoxal.

En outre, le rôle des peptides exprimé par chacune de ces populations n'a encore jamais été rapporté. Il n'est donc pas clair de savoir si le peptide CRH pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la signalisation et la régulation des états de vigilance, en particulier les états de sommeil. Bien que le CRH soit principalement connu pour son action excitatrice sur les structures en aval (Valentino et al., 1983 ; Eberly et al., 1983), il est probablement co-libéré avec le GABA par les neurones du VLPO, ce qui soulève la question de l'effet net qu'aurait cette signalisation sur les cibles post-synaptiques. Une section sera entièrement consacrée à ces questionnements dans la discussion générale.

De manière intéressante, nous avons montré que les neurones VLPO^{CRH} reçoivent des entrées excitatrices directes du PFC et que l'inhibition de ces neurones en conditions basales n'a aucun effet sur l'architecture du sommeil. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans notre précédente étude de la voie PFC-VLPO (voir Chapitre 4). Il est donc tentant de proposer que les neurones CRH soient les effecteurs de cette voie, au sein du VLPO, et qu'ils soient donc spécifiquement recrutés en conditions de stress. Ainsi, étudier leur rôle dans la régulation du sommeil suite à la défaite sociale nous a semblé particulièrement important et des expériences sont en cours.

Chapitre 6 : Automatisation de la classification du sommeil paradoxal

Depuis la création de l'équipe, un des principaux axes de recherche a été d'automatiser la classification des états de vigilance. Une méthode de classification semi-automatique, et exclusivement basée sur des signaux intra-cérébraux, a été publiée (Bagur et al., 2018). Brièvement, cette méthode permet de distinguer l'éveil des états de sommeil grâce aux oscillations gamma présentes dans le bulbe olfactif, puis de distinguer le sommeil paradoxal du sommeil lent grâce au rythme thêta dans l'hippocampe. Par la suite, un fort accent a été mis sur le sommeil lent, notamment avec l'élaboration d'une classification plus fine ayant permis de mettre en évidence les trois sous-stades de sommeil lent (N1, N2 et N3), initialement décrits chez l'homme, dans une version adaptée aux rongeurs (Lacroix et al., 2018). Par conséquent, le sommeil paradoxal a reçu moins d'attention.

J'ai donc été la première étudiante de l'équipe à travailler sur un projet dans lequel le sommeil paradoxal occupait une place centrale. Bien que notre méthode de classification semi-automatique soit satisfaisante sur les quantités globales de sommeil paradoxal, certains aspects plus subtils comme le nombre et la durée des épisodes ont soulevé des questionnements. Ceci a été particulièrement frappant avec l'apparition d'épisodes de sommeil paradoxal très courts suite à la défaite sociale (voir Chapitre 4). La méthode la plus fiable pour ne pas rater de petits épisodes et s'assurer que, même s'ils étaient très courts, il s'agissait bien de sommeil paradoxal, s'est avérée être une correction *post hoc* manuelle par des évaluateurs experts. Cette correction manuelle allait à l'encontre de la volonté d'automatiser la classification et nous avons alors cherché à mettre au point une méthode de classification automatique du sommeil paradoxal plus adaptée et qui puisse donner sens à la classification manuelle effectuée par des évaluateurs. Ce chapitre s'articule donc autour de la recherche de paramètres les plus objectifs possibles et s'inscrit dans une démarche de reproductibilité maximale.

Lors d'une classification manuelle, une fenêtre temporelle de quelques secondes est fixée (souvent à 3 s). Si de fortes oscillations thêta sont présentes sur la majorité de cette fenêtre, associées à un EMG faible, l'évaluateur classifierait cette période comme du sommeil paradoxal. En revanche, si la période avec un fort thêta est trop courte, l'évaluateur ne la classifierait pas en sommeil paradoxal. Il en va de même si deux périodes de fort thêta sont séparées par un intervalle long, dépourvu d'oscillations thêta. Les décisions prises peuvent donc être modulées selon la puissance des oscillations thêta (en association avec l'EMG), la durée des épisodes de sommeil paradoxal considérés et la durée de l'intervalle qui les sépare. Elles peuvent aussi varier selon l'évaluateur qui effectue la classification. Pour mettre au point notre méthode, nous avons cherché à optimiser des paramètres qui reflètent ces 3 critères afin de les rendre objectifs et quantifiables.

Bref rappel sur la méthode semi-automatique utilisée au laboratoire

Avant de présenter les paramètres que nous avons utilisés, ainsi que notre nouvelle méthode, voici un bref rappel de la méthode semi-automatique actuellement en place au sein de l'équipe (voir Annexe 1).

La première étape de notre méthode semi-automatique classe les données en périodes d'éveil ou de sommeil sur la base des oscillations gamma présentes dans le bulbe olfactif (ou avec le mouvement issu de l'accéléromètre placé sur la tête de l'animal) (Bagur et al., 2018). La puissance gamma dans le bulbe olfactif montre une distribution bimodale : elle est constituée d'un pic de valeurs faibles correspondant au sommeil, et d'un second pic de valeurs fortes correspondant à l'éveil. Cette répartition des valeurs peut être modélisée par deux distributions gaussiennes dont l'intersection correspond au seuil sommeil-éveil. La deuxième étape classe les données de sommeil ainsi obtenues en périodes de sommeil lent ou de sommeil paradoxal sur la base du rapport de puissances thêta/delta en provenance de l'hippocampe. En effet, le rapport thêta/delta montre un pic clair de valeurs faibles correspondant au sommeil lent prédominant, et une « bosse aplatie » correspondant aux périodes de sommeil paradoxal qui sont plus rares. Le pic de valeurs faibles peut être modélisé par une distribution gaussienne permettant ainsi de placer un seuil pour distinguer le sommeil paradoxal du sommeil lent. Toutefois, le placement du seuil sur la distribution du rapport de puissances thêta/delta de l'HPC permettant de distinguer le sommeil paradoxal du sommeil lent peut s'avérer être délicat lorsque le sommeil paradoxal est perturbé et, en

particulier, s'il est drastiquement diminué voire absent. C'est cette dernière étape que nous avons cherché à optimiser dans cette partie de ma thèse.

Présentation des trois paramètres que nous avons utilisés

La notion de **seuil** traduit la présence d'oscillations thêta et permet de classer les données soit dans une période de sommeil paradoxal, soit de sommeil lent. Ce paramètre se comportera comme le seuil utilisé dans notre classification semi-automatique (séparation des deux types de sommeil sur la base du rapport de puissance theta/delta de l'HPC), c'est la façon de le définir qui sera optimisée ici.

Paramètre de **fusion (ou merge)** : reflète l'intervalle de temps entre deux épisodes de sommeil paradoxal contigus. Si deux épisodes sont séparés par un intervalle de temps inférieur à la valeur de fusion, alors ils sont fusionnés et considérés comme un seul et même épisode. À l'inverse, si deux épisodes de sommeil paradoxal sont séparés par un intervalle de temps supérieur à la valeur de fusion, alors ils demeurent deux épisodes distincts (**Fig. 6.1A**).

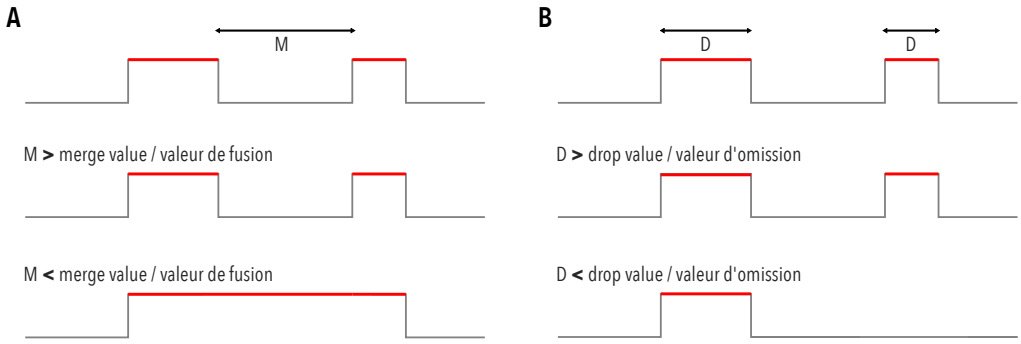


Figure 6.1 Représentation schématique des paramètres de fusion et d'omission utilisées par la méthode de classification
A. Représentation schématique d'un hypnogramme de souris avec deux épisodes de sommeil paradoxal (en rouge). Le paramètre de fusion (ou *merge*) reflète la durée de l'intervalle entre ces deux épisodes (en haut). Si la durée de l'intervalle M est supérieure à la valeur de fusion, alors la classification considère qu'il y a deux épisodes de sommeil paradoxal distincts (au milieu). Si la durée de l'intervalle M est inférieure à la valeur de fusion, alors la classification considère qu'il n'y a qu'un seul et même épisode (en bas). **B.** Représentation schématique d'un hypnogramme de souris avec deux épisodes de sommeil paradoxal (en rouge). Le paramètre d'omission (ou *drop*) reflète la durée d'un épisode de sommeil paradoxal (en haut). Si la durée de l'épisode D est supérieure à la valeur d'omission, alors la classification considère qu'il y a deux épisodes de sommeil paradoxal (au milieu). Si la durée de l'épisode D est inférieure à la valeur d'omission, alors la classification ne considère plus l'épisode de sommeil paradoxal trop court (en bas). Pour plus de simplicité, les paramètres de fusion et d'omission sont représentés séparément ici, mais lors de la classification, ils peuvent s'auto-influencer. Il est également à noter que le paramètre de fusion est appliqué en premier lors de la classification.

Paramètre d'**omission (ou drop)** : reflète la durée d'un épisode de sommeil paradoxal. Si un épisode de sommeil paradoxal a une durée inférieure à la valeur d'omission, alors il est supprimé, car considéré comme trop court. À l'inverse, si un épisode de sommeil paradoxal est supérieur à la valeur d'omission, il n'est pas modifié (**Fig. 6.1B**).

L'objectif de notre nouvelle méthode est de déterminer les meilleures valeurs de chacun des paramètres en évaluant l'impact qu'ils ont sur différents descripteurs du sommeil paradoxal (pourcentage, nombre et durée des épisodes) et en le comparant à la classification effectuée manuellement par des évaluateurs experts.

Définition d'un seuil objectif pour détecter le sommeil paradoxal

La première étape a été d'établir une nouvelle méthode pour définir le seuil permettant de distinguer le sommeil paradoxal du sommeil lent.

Pour ce faire, nous avons réalisé une fenêtre glissante sur un ensemble de valeurs possibles pour chacun des paramètres : valeurs de seuil, de fusion et d'omission. Ensuite, pour chaque combinaison de valeurs (seuil-fusion ou seuil-omission), nous avons étudié les conséquences sur différents descripteurs du sommeil paradoxal (pourcentage, nombre d'épisodes et durée moyenne des épisodes). Ces résultats sont illustrés par des matrices (**Fig. 6.2**, à gauche) où chaque axe correspond à l'ensemble des valeurs possibles d'un des paramètres (seuil en fonction de fusion (**Fig. 6.2A,C,E**) ou seuil en fonction d'omission (**Fig. 6.2B,D,F**)) et la couleur des pixels reflète la quantification d'un des descripteurs du sommeil paradoxal (pourcentage (**Fig. 6.2A-B**), nombre d'épisodes (**Fig. 6.2C-D**) et durée moyenne des épisodes (**Fig. 6.2E-F**)). En outre, pour chaque matrice exemple, nous avons mis en évidence, par des points bleus, les pixels pour lesquels la valeur du descripteur de sommeil paradoxal obtenue est identique à la valeur issue de la classification manuelle.

De manière générale, pour l'ensemble des souris (n=14), nous avons obtenu des résultats similaires pour chaque paramètre. Pour cette raison, et pour plus de simplicité, nous avons illustré, et décrirons ci-dessous, les résultats pour une souris exemple.

Nous avons identifié les valeurs de chaque combinaison (seuil-fusion ou seuil-omission) qui produisent des résultats aberrants afin d'affiner notre zone d'analyse. Par exemple, un seuil proche de 0 a pour conséquence que tout le sommeil de la session soit classé comme du sommeil paradoxal (**Fig. 6.2A-B**, à gauche). À l'inverse, un seuil proche de 2 induit qu'aucune période de sommeil ne soit classée en sommeil paradoxal. Entre ces deux extrêmes, le

pourcentage de sommeil paradoxal obtenu se place dans un intervalle plus acceptable et physiologique (≈ 8-10 %), en accord avec la littérature.

De manière intéressante, les valeurs de fusion ou d'omission ne semblent pas avoir un fort impact sur la quantification du pourcentage de sommeil paradoxal. En effet, le pourcentage obtenu pour un seuil donné, en fonction des valeurs de fusion (**Fig. 6.2A**) augmente de manière progressive (ou diminue progressivement dans le cas du paramètre d'omission, illustré sur la **Figure 6.2B**). Cette évolution progressive se caractérise par des zones stables où plusieurs pixels contigus ont la même valeur (même couleur). Ces résultats suggèrent qu'un faible changement des valeurs de fusion ou d'omission n'affectera pas drastiquement la quantité de sommeil paradoxal obtenue. En revanche, ce n'est pas systématiquement le cas pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal (**Fig. 6.2C-D**) ou leur durée moyenne (**Fig. 6.2E-F**). En effet, on observe des zones de changements plus abruptes, à la fois en fonction des valeurs de seuil, mais aussi en fonction des valeurs de fusion ou d'omission. Autrement dit, plusieurs pixels contigus peuvent avoir une valeur (ou une couleur) très différente. Ces résultats suggèrent qu'un faible changement des valeurs de fusion ou d'omission peut fortement influencer le nombre ou la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal obtenus.

Afin d'identifier des zones stables traduisant un seuil qui ne serait pas trop sensible à de petits changements dans les paramètres de fusion ou d'omission, nous avons cherché à évaluer cette variabilité en calculant le coefficient de variation du pourcentage de sommeil paradoxal pour chaque valeur de seuil possible (**Fig. 6.2A-B**, à droite). Le coefficient de variation est calculé comme : l'écart type du pourcentage de sommeil paradoxal obtenu pour un seuil (soit une ligne de la matrice) divisé par la moyenne du pourcentage sur cette même ligne.
Ces résultats mettent en évidence que pour des valeurs faibles de seuil (inférieures à 1), il y a une importante variabilité du pourcentage de sommeil paradoxal obtenu (**Fig. 6.2A**, à droite). En revanche, pour un seuil supérieur à 1, on observe que le coefficient de variation est plus faible ; par exemple, la valeur de fusion entraîne moins de variabilité sur le pourcentage de sommeil paradoxal obtenu (**Fig. 6.2A**, à droite). De manière intéressante, on observe un pattern similaire pour l'ensemble des courbes reflétant le coefficient de variation de chaque paramètre (**Fig. 6.2A-E,G**) ; à l'exception de la durée moyenne des épisodes en fonction de la combinaison de valeurs seuil-omission (**Fig. 6.2F**, à droite). En effet, dans ce cas, le coefficient de variation est relativement constant quel que soit le seuil.

Ces résultats indiquent que, quelle que soit la valeur du seuil choisie, la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal obtenue est tout aussi sensible au paramètre d'omission (**Fig. 6.2F**).

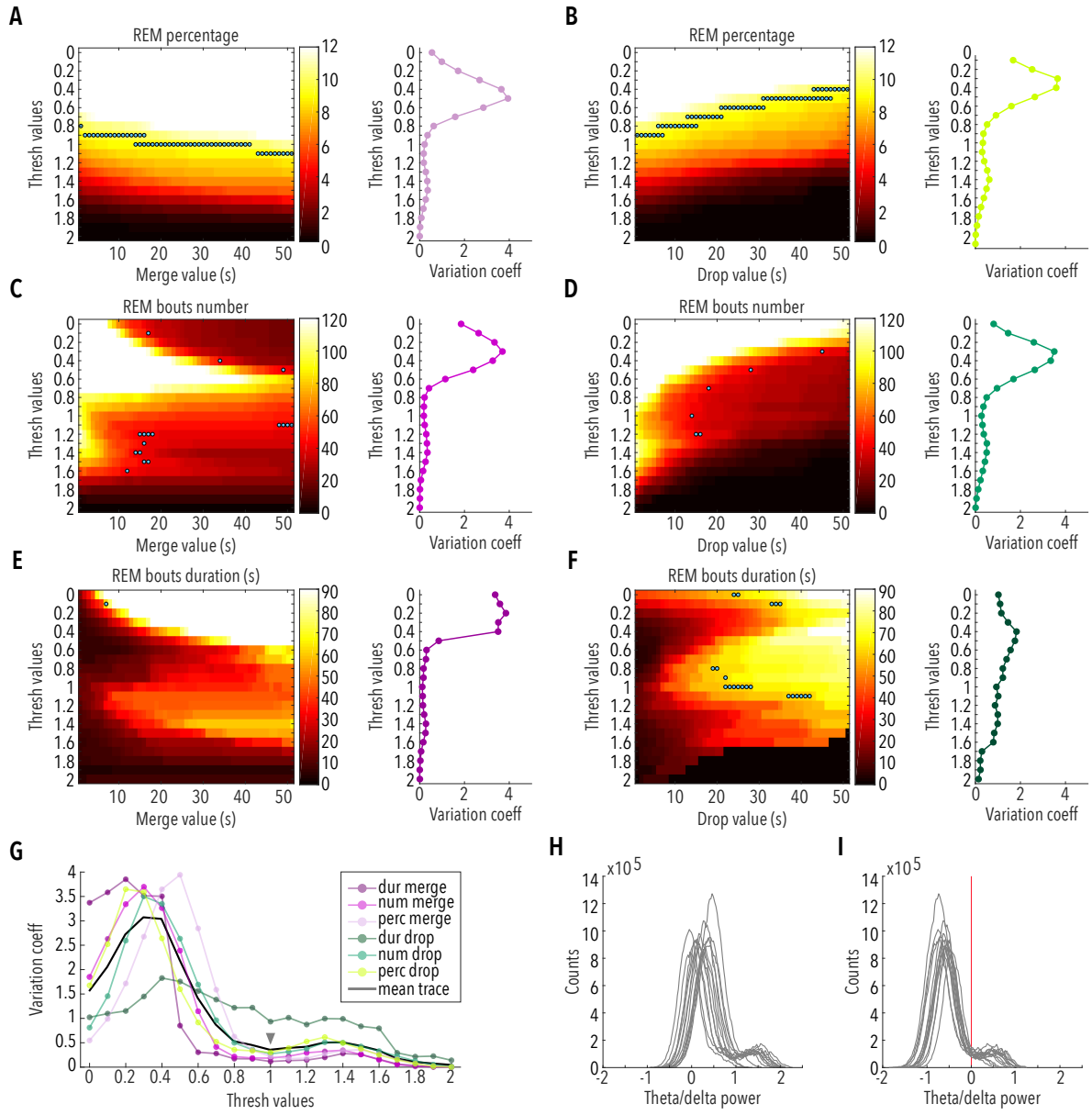


Figure 6.2. Définition d'un seuil objectif pour détecter le sommeil paradoxal
A. Gauche : exemple, pour une souris, de matrice illustrant le pourcentage de sommeil paradoxal (représenté par la couleur) en fonction de différentes valeurs de seuils et de différentes valeurs de fusion (ou *merge*). Les points bleus sur la matrice mettent en évidence les pixels dont la valeur correspond à la valeur moyenne du pourcentage de sommeil paradoxal obtenue à l'issue de la classification manuelle par un évaluateur. Droite : courbe représentant le coefficient de variation du pourcentage de sommeil paradoxal pour chaque valeur de seuil, autrement dit, pour chaque ligne de la matrice.

B. Gauche : exemple, pour une souris, de matrice illustrant le pourcentage de sommeil paradoxal (représenté par la couleur) en fonction de différentes valeurs de seuils et de différentes valeurs d'omission (ou *drop*). Les points bleus sur la matrice mettent en évidence les pixels dont la valeur correspond à la valeur moyenne du pourcentage de sommeil paradoxal obtenue à l'issue de la classification manuelle par un expert. Droite : courbe représentant le coefficient de variation du pourcentage de sommeil paradoxal pour chaque valeur de seuil, autrement dit pour chaque ligne de la matrice. **C.** Comme pour A. mais pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal. **D.** Comme pour B. mais pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal. **E.** Comme pour A. mais pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal. **F.** Comme pour B. mais pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal. **G.** Superposition des courbes correspondant aux coefficients de variation des 6 paramètres précédemment illustrés, ainsi que la courbe moyenne (en gris) calculée sur ces 6 paramètres. La courbe moyenne permet de déterminer le seuil pour distinguer le sommeil paradoxal du sommeil lent. Le seuil correspond au point d'inflexion le plus faible de la courbe (indiqué par la flèche). **H.** Superposition de la distribution du rapport de puissance thêta/delta de l'hippocampe pour chaque souris en fonction de la valeur du seuil définie automatiquement. **I.** Superposition de la distribution du rapport de puissance thêta/delta de l'hippocampe pour chaque souris après réalignement basé sur la nouvelle valeur du seuil défini selon la méthode présentée en G.

Afin de déterminer le meilleur seuil qui permette de distinguer le sommeil paradoxal du sommeil lent, on cherche donc à se placer dans une zone stable dans laquelle un changement minime de la valeur d'un des paramètres (seuil, fusion ou omission) n'induit pas des changements drastiques sur les descripteurs du sommeil paradoxal (pourcentage, nombre d'épisodes et leur durée).

Pour ce faire, nous avons superposé l'ensemble des 6 courbes correspondant aux coefficients de variation de chacun des paramètres présentés précédemment (**Fig. 6.2G**). Nous avons tenté d'identifier la valeur de seuil qui regroupe un maximum des points d'inflexion issus de chaque courbe. Pour l'identifier objectivement, nous avons calculé la courbe moyenne des 6 coefficients de variation (**Fig. 6.2G**, courbe noire) et sélectionné le point d'inflexion de cette courbe, autrement dit, le point possédant la plus faible variabilité. Pour la souris illustrée ici, la valeur de seuil retenue est 1 (**Fig. 6.2G**, flèche).

Pour s'assurer que cette nouvelle méthode de sélection du seuil permet de distinguer sans ambiguïté le sommeil paradoxal du sommeil lent, nous avons regardé son incidence sur la distribution du rapport de puissance thêta/delta (**Fig. 6.2I**) en la comparant à la valeur automatiquement sélectionnée par notre méthode semi-automatique (**Fig. 6.2H**). Pour ce faire, nous avons corrigé le seuil par défaut (issu de la classification semi-automatique) par la nouvelle valeur de seuil pour chaque souris. Nous avons observé que les distributions se superposent parfaitement (**Fig. 6.2I**), en particulier, on voit que le seuil sépare bien le grand

pic de valeurs faibles correspondant au sommeil lent du petit pic de valeurs élevées correspondant au sommeil paradoxal. À l'inverse, cette distinction est moins claire lorsqu'on regarde les distributions thêta/delta de chaque souris avec le seuil par défaut issu de la méthode semi-automatique (**Fig. 6.2H**).
Ces résultats mettent en évidence que la nouvelle façon d'identifier le seuil est une méthode robuste qui fonctionne/s'adapte à l'ensemble des souris.

Influence des paramètres de fusion et d'omission sur les descripteurs du sommeil paradoxal

Une fois le seuil déterminé, l'étape suivante a été d'optimiser la combinaison de valeurs de fusion et d'omission à utiliser. Pour ce faire, nous avons réalisé des matrices représentant le pourcentage (**Fig. 6.3A**), le nombre (**Fig. 6.3C**) et la durée moyenne des épisodes (**Fig. 6.3E**) de sommeil paradoxal (représentés par la couleur) en fonction, à la fois, des valeurs de fusion et d'omission possibles. Pour chaque descripteur du sommeil paradoxal, des exemples issus de deux souris sont représentés (**Fig. 6.3A,C,E**) ainsi qu'une matrice reflétant le coefficient de variation à travers l'ensemble des souris (n = 14 ; **Fig. 6.3B,D,F**). Comme précédemment, pour chaque matrice exemple, nous avons mis en évidence, par des points bleus, les pixels pour lesquels la valeur du descripteur de sommeil paradoxal obtenue est identique à la valeur issue de la classification manuelle pour la souris considérée.

Finalement, notre approche consiste à sélectionner des combinaisons de valeurs de fusion et d'omission hypothétiques et à regarder l'impact que chaque combinaison aurait sur les descripteurs du sommeil paradoxal. Pour les choisir, nous avons visualisé quelles combinaisons de valeurs induisent le moins de variabilité, car l'idée est de pouvoir construire une méthode robuste à travers l'ensemble des souris qui ne soit pas sensible à de faibles changements d'une des valeurs.

Concernant le pourcentage de sommeil paradoxal, nous avons observé un gradient progressif à travers les matrices exemples (**Fig. 6.3A**). En effet, un pourcentage élevé de sommeil paradoxal serait obtenu si la classification utilisait des valeurs de fusion faibles et d'omission élevées ; alors qu'en évoluant au coin opposé de la matrice, c'est-à-dire vers des valeurs de fusion élevées et d'omission plus faibles, le pourcentage de sommeil paradoxal obtenu serait plus faible (**Fig. 6.3A**).

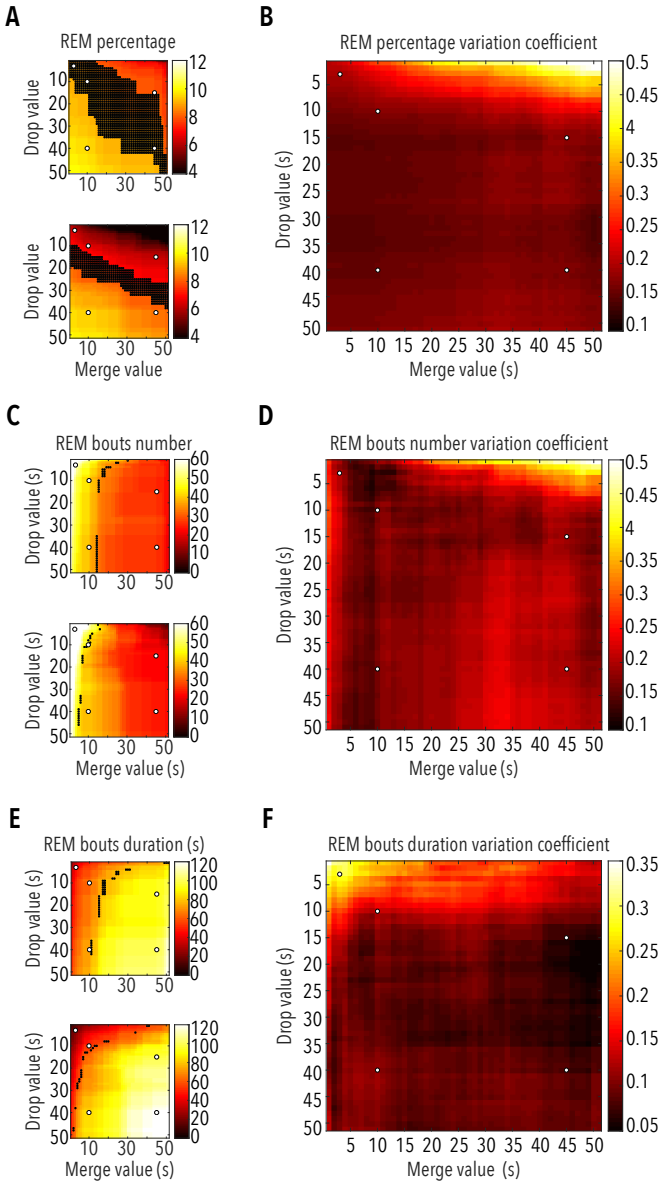


Figure 6.3. Influence des paramètres de fusion et d'omission sur les descripteurs du sommeil paradoxal

A. Exemples pour deux souris des matrices illustrant le pourcentage de sommeil paradoxal (représenté par la couleur) en fonction des valeurs de fusion (ou *merge*) et d'omission (ou *drop*). Les points bleus mettent en évidence les pixels dont la valeur correspond à la valeur moyenne du pourcentage de sommeil paradoxal obtenue à l'issue de la classification manuelle par un expert. Les points blancs mettent en évidence des combinaisons d'intérêt de valeurs de fusion et d'omission. **B.** Matrice illustrant le coefficient de variation du pourcentage de sommeil paradoxal (représenté par la couleur) à travers toutes les souris (n = 13) en fonction des différentes valeurs de fusion et d'omission. Les points blancs mettent en évidence des combinaisons d'intérêt de valeurs de fusion et d'omission. **C.** Comme pour A. mais pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal. **D.** Comme pour B. mais pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal. **E.** Comme pour A. mais pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal. **F.** Comme pour B. mais pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal.

De manière intéressante, nous avons observé relativement peu de variabilité concernant le pourcentage de sommeil paradoxal obtenu à travers l'ensemble des souris (**Fig. 6.3B**). Ces résultats suggèrent qu'il y a peu d'influence des valeurs de fusion et d'omission sur le pourcentage de sommeil paradoxal obtenu, à l'exception d'un pôle de la matrice correspondant à des valeurs de fusion élevées et d'omissions faibles. Ainsi, des changements subtils des valeurs de fusion et d'omission n'induisent pas de changements drastiques sur le pourcentage de sommeil paradoxal obtenu à l'issue de la classification.

Pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal, nous avons observé un grand nombre d'épisodes lorsque les valeurs de fusion sont faibles (**Fig. 6.3C**). En revanche, à partir de valeurs de fusion de 20 à 30 s, la classification engendrerait un nombre d'épisodes plus faible et relativement constant pour l'ensemble de ces valeurs. De plus, le nombre d'épisodes obtenu semble beaucoup moins sensible aux changements de valeurs d'omission puisqu'il reste stable au sein de chaque colonne des matrices (**Fig. 6.3C**). Finalement, le nombre d'épisodes obtenus à l'issue de la classification semble davantage sensible aux valeurs de fusion choisies qu'aux valeurs d'omission.

À travers l'ensemble des souris, nous avons observé une faible variabilité du nombre d'épisodes de sommeil paradoxal obtenus pour des valeurs de fusion faibles (**Fig. 6.3D**). Cette variabilité est d'autant plus faible lorsque les valeurs d'omission sont également faibles. À l'inverse, au pôle de la matrice correspondant à des valeurs de fusion élevées et d'omission faibles, nous avons observé une plus grande variabilité du nombre d'épisodes. Nous avons également observé une variabilité inter-individu relativement homogène pour une combinaison de valeurs élevées de fusion et d'omission. L'ensemble de ces observations confirment que le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal que l'on obtiendrait à l'issu de la classification est plus sensible aux valeurs de fusion et que des changements dans les valeurs d'omission auront moins d'impact sur le nombre d'épisodes obtenus.

Concernant la durée des épisodes de sommeil paradoxal, nous avons observé qu'une combinaison de valeurs de fusion et d'omission faibles induit des épisodes courts (**Fig. 6.3E**). À l'opposé de la matrice, pour une combinaison de valeurs de fusion et d'omission élevées, la classification engendrerait des épisodes plus longs. La durée moyenne des épisodes semble donc sensible aux changements de valeurs de fusion et d'omission.

Pour l'ensemble des souris, nous avons observé une forte variabilité de la durée des épisodes lorsque l'on considère des valeurs d'omission faibles (**Fig. 6.3F**). Concernant les valeurs de

fusion, il y a une forte variabilité interindividuelle pour des valeurs faibles. À l'inverse, cette variabilité est moins importante pour des valeurs de fusion élevées. Pour des combinaisons de valeurs de fusion et d'omission centrales (comprises environ entre 15 s et 45 s) on observe une assez faible variabilité inter-individuelle de la durée moyenne des épisodes.

Nous avons donc sélectionné quatre points correspondant à quatre combinaisons de valeurs de fusion et d'omission d'intérêt qui reflètent des zones stables à des pôles opposés dans les matrices illustrant les coefficients de variations à travers toutes les souris (**Fig. 6.3B,D,F**). À ces quatre combinaisons, nous avons ajouté le point correspondant aux valeurs par défaut utilisées dans notre méthode semi-automatique (fusion 3s et omission 3s).
Ces 5 combinaisons de valeurs nous ont permis de quantifier leur influence sur les descripteurs du sommeil paradoxal en moyenne sur l'ensemble des souris.

Impact de différentes combinaisons de valeurs des paramètres de fusion et d'omission sur l'architecture du sommeil paradoxal

Après avoir sélectionné un ensemble de 5 combinaisons de valeurs de fusion et d'omission, nous avons comparé l'architecture du sommeil paradoxal dans ces 5 conditions à la classification manuelle effectuée sur les mêmes données.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'architecture globale du sommeil paradoxal grâce aux hypnogrammes individuels de chaque souris (**Fig. 6.4A**). Cette représentation permet d'appréhender l'effet des différentes combinaisons de valeurs, jusque là observé sur des matrices, sur l'architecture du sommeil paradoxal. Par exemple, dans les cas où la valeur de fusion est fixée à 10 s, une valeur d'omission plus importante semble induire un nombre moins important d'épisodes. À l'inverse, pour une valeur d'omission équivalente, fixée à 40 s par exemple, associée à une valeur de fusion élevée, entraîne un nombre plus faible d'épisodes que lorsque la valeur de fusion est plus faible. L'ensemble de ces observations est cohérent avec les conclusions tirées précédemment.

Nous avons ensuite réalisé des quantifications moyennes sur l'ensemble des souris (n = 14) pour le pourcentage, le nombre et la durée des épisodes de sommeil paradoxal afin de valider nos précédentes observations. Les quantifications ont été effectuées en moyenne au cours de l'enregistrement sur des fenêtres d'une heure (**Fig. 6.4B,C,D** à gauche) mais aussi en moyenne sur l'ensemble de la session de sommeil (**Fig. 6.4B,C,D** à droite).

Pour le pourcentage de sommeil paradoxal, nous avons observé que seule la combinaison de valeurs de fusion à 10s et d'omission à 40s montrait des quantités significativement inférieures au pourcentage obtenu manuellement (ANOVA à 1 facteur avec mesures répétées suivie d'un test post hoc de Wilcoxon et d'une correction de Benjamini-Hochberg pour comparaisons multiples : manuelle vs merge3-drop3 : zval=1.7230, p=0.2012 ; manuelle vs merge10-drop10 : zval=1.5392, p=0.2195 ; manuelle vs merge45-drop15 : zval=-1.3095, p=0.2012 ; manuelle vs merge10-drop40 : zval=-3.5609, p=0.0026 ; manuelle vs merge45-drop40 : zval=-1.4014, p=0.2012 ; **Fig. 6.4B**).

Concernant le nombre d'épisode de sommeil paradoxal, la combinaison de valeurs par défaut ; à savoir, fusion à 3s et omission à 3s, engendre un nombre d'épisodes significativement plus élevé que n'importe quelle autre combinaison (ANOVA à 1 facteur avec mesures répétées suivie d'un test post hoc de Wilcoxon et d'une correction de Benjamini-Hochberg pour comparaisons multiples : merge3-drop3 vs manuelle : zval=-4.4823, p=0 ; merge3-drop3 vs merge10-drop10 : zval=4.4824, p=0 ; merge3-drop3 vs merge45-drop15 : zval=4.4817, p=0 ; merge3-drop3 vs merge10-drop40 : zval=4.4860, p=0 ; merge3-drop3 vs merge45-drop40 : zval=4.4842, p=0 ; **Fig. 6.4C**). De plus, le nombre d'épisodes obtenu pour les combinaisons de valeurs fusion et omission à 10s ainsi que fusion à 45s et omission à 40s ne sont pas différent du nombre d'épisode obtenu à l'issu de la classification manuelle (ANOVA à 1 facteur avec mesures répétées suivie d'un test post hoc de Wilcoxon et d'une correction de Benjamini-Hochberg pour comparaisons multiples : manuelle vs merge3-drop3 : zval=-4.4824, p=0 ; manuelle vs merge10-drop10 : zval=1.0146, p=0.4335 ; manuelle vs merge45-drop15 : zval=2.9915, p=0.0140 ; manuelle vs merge10-drop40 : zval=4.4873, p=0 ; manuelle vs merge45-drop40 : zval=2.0253, p=0.1278 ; **Fig. 6.4C**).

A l'inverse, pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal, la combinaison de valeurs par défaut (fusion et omission à 3s) obtient une durée significativement plus élevée que pour toutes les autres combinaisons (ANOVA à 1 facteur avec mesures répétées suivie d'un test post hoc de Wilcoxon et d'une correction de Benjamini-Hochberg pour comparaisons multiples : merge3-drop3 vs manuelle : zval=4.4811, p=0 ; merge3-drop3 vs merge10-drop10 : zval=-4.4811, p=0 ; merge3-drop3 vs merge45-drop15 : zval=-4.4811, p=0 ; merge3-drop3 vs merge10-drop40 : zval=-4.4811, p=0 ; merge3-drop3 vs merge45-drop40 : zval=-4.4811, p=0 ; **Fig. 6.4D**). En outre, uniquement la combinaison de valeurs fusion et omission à 10s obtient une durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal qui n'est pas différente de celle obtenue dans la classification manuelle (ANOVA à 1 facteur avec mesures

répétées suivie d'un test post hoc de Wilcoxon et d'une correction de Benjamini-Hochberg pour comparaisons multiples : manuelle vs merge3-drop3 : zval=4.4811, p=0 ; manuelle vs merge10-drop10 : zval=1.4018, p=0.1610 ; manuelle vs merge45-drop15 : zval=-4.3432, p=0 ; manuelle vs merge10-drop40 : zval=-4.4352, p=0 ; manuelle vs merge45-drop40 : zval=-3.7917, p=0.002 ; **Fig. 6.4D**).

Finalement, l'ensemble de ces résultats mettent en évidence que le pourcentage de sommeil paradoxal n'est que peu sensible aux différentes combinaisons de valeurs de fusion et d'omission, conformément à nos précédentes observations. De manière surprenante, les valeurs par défaut de notre méthode semi-automatique (fusion et omission à 3 s) semblent induire un sommeil paradoxal plus fragmenté que les autres combinaisons. Enfin, la combinaison de valeurs de fusion et d'omission à 10 s semble être celle qui reflète le mieux l'architecture du sommeil paradoxal issue de la classification manuelle.

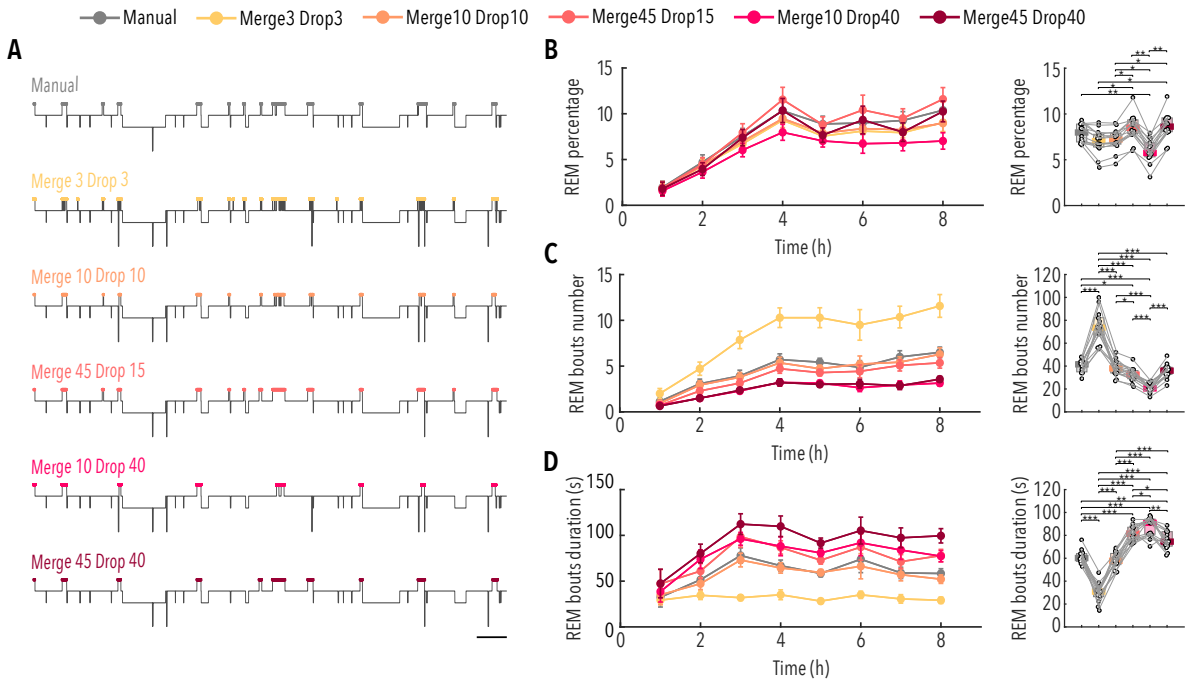


Figure 6.4. Impact de différentes combinaisons de valeurs pour les paramètres de fusion et d'omission sur l'architecture du sommeil paradoxal

A. Exemples représentatifs d'hypnogrammes, pour une souris, en fonction des différentes combinaisons de valeurs pour les paramètres de fusion (*merge*) et d'omission (*drop*) par rapport à l'hypnogramme issu de la classification manuelle des états de vigilance. **B.** Pourcentage de sommeil paradoxal au cours de la session de sommeil (à gauche) et en moyenne sur la session (à droite) pour chacune des combinaisons de valeurs des paramètres de fusion et d'omission par rapport à la classification manuelle. **C.** Comme pour B. mais pour le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal. **D.** Comme pour B. mais pour la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal.

Validation de la méthode de détection du sommeil paradoxal sur des données de sommeil en condition de stress

Afin d'identifier la meilleure combinaison de valeurs de fusion et d'omission, qui soit robuste, nous avons implémenté cette méthode sur différents types de données, en particulier, dans des conditions qui affectent spécifiquement le sommeil paradoxal. Pour ce faire, nous avons utilisé les données de défaite sociale issues du Chapitre 4. Nous avons reproduit les quantifications du pourcentage, du nombre d'épisodes et de leur durée moyenne pour les souris contrôles et les souris soumises à la défaite sociale sur les fenêtres de temps utilisées précédemment ; à savoir, les deux premières heures après la défaite sociale correspondant à l'insomnie avec une forte suppression de sommeil paradoxal et les quatre dernières heures de la session de sommeil correspondant à la période tardive de fragmentation du sommeil paradoxal.

L'ensemble des combinaisons de valeurs de fusion et d'omission capture la suppression du sommeil paradoxal au cours de la phase initiale (test des rangs de Wilcoxon entre les conditions contrôle et défaite sociale pendant la phase initiale : manuelle : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge3-drop3 : zval=3.8467, p=1.1971e-04 ; merge10-drop10 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge45-drop15 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge10-drop40 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge45-drop40 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; **Fig. 6.5A,D,G,J,M,P**). Pendant la phase tardive, toutes les autres combinaisons, à l'exception de la combinaison de valeurs de fusion à 10s et d'omission à 40s, montrent un retour des quantités de sommeil paradoxal après SDS au niveau des quantités observées en condition contrôle (test des rangs de Wilcoxon entre les conditions contrôle et défaite sociale pendant la phase tardive : manuelle : zval=0.7940, p=0.4272 ; merge3-drop3 : zval=1.0675, p=0.2857 ; merge10-drop10 : zval=1.0675, p=0.2857 ; merge45-drop15 : zval=-1.0675, p=0.2857 ; merge10-drop40 : zval=2.3267, p=0.0200 ; merge45-drop40 : zval=-0.5201, p=0.6030 ; **Fig. 6.5A,D,G,J,M,P**).

Pour le nombre d'épisodes en phase initiale, nous avons montré que toutes les combinaisons de valeurs de fusion et d'omission reproduisent la forte diminution du nombre d'épisodes de sommeil paradoxal pour la condition SDS par rapport à la condition contrôle observée avec la classification manuelle (**Fig. 6.5B,E,H,K,N,Q**). En revanche, pour la période tardive, seules les combinaisons de valeurs fusion 10 s et omission 40 s ainsi que fusion 45 s et omission 40 s montrent un retour du nombre d'épisodes de sommeil paradoxal en condition SDS au même niveau qu'en condition contrôle, à l'image de la classification manuelle (test des rangs de

Wilcoxon entre les conditions contrôle et défaite sociale pendant la phase tardive : manuelle : zval=-0.6590, p=0.5099 ; merge3-drop3 : zval=-2.3325, p=0.0197 ; merge10-drop10 : zval=-2.0867, p=0.0369 ; merge45-drop15 : zval=-2.0875, p=0.0368 ; merge10-drop40 : zval=1.3208, p=0.1866 ; merge45-drop40 : zval=0.0826, p=0.9342 ; **Fig. 6.5B,E,H,K,N,Q**). Toutefois, malgré une différence statistique similaire entre les groupes contrôle et SDS, le nombre moyen d'épisodes semble inférieur pour ces 2 combinaisons par rapport à la classification manuelle (les tests statistiques pour confirmer ces observations devront être réalisés).

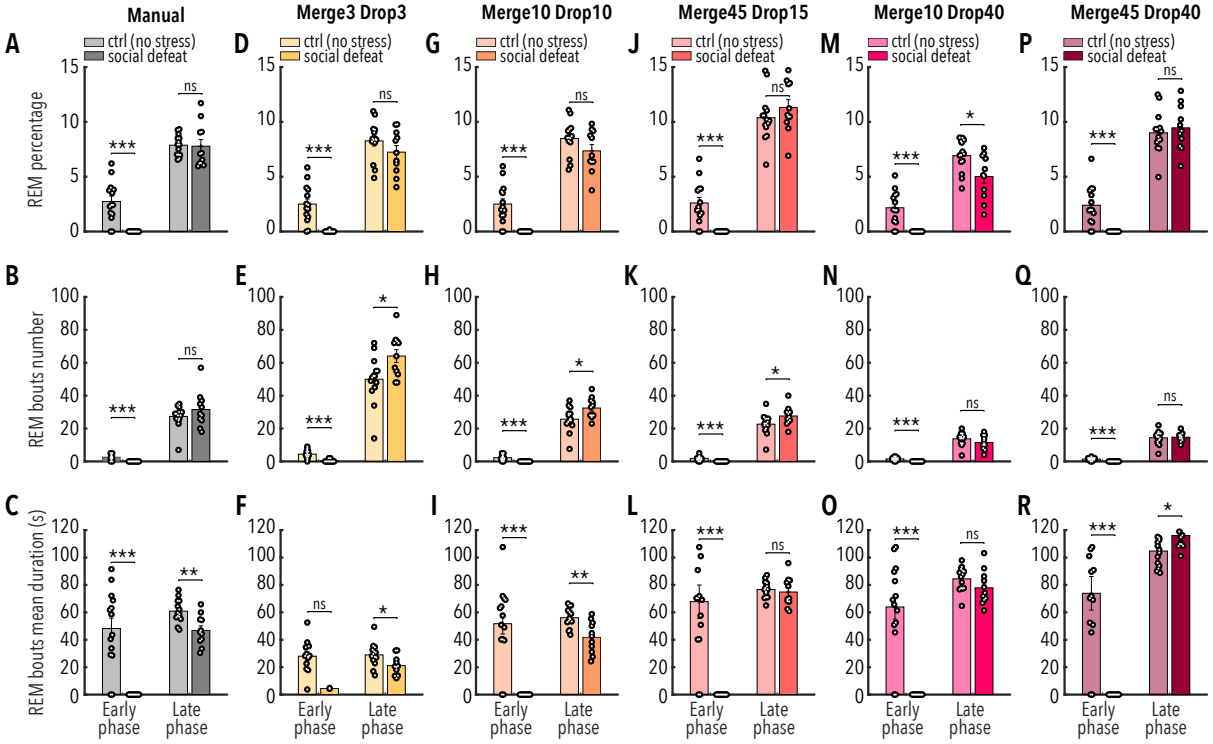


Figure 6.5. Validation de la méthode de détection du sommeil paradoxal sur des données de sommeil en condition de stress

A-C. Pourcentage (**A**), nombre d'épisodes (**B**) et durée moyenne des épisodes (**C**) de sommeil paradoxal issus de la classification manuelle pour des souris contrôles non-stressées (n = 14, couleur claire) et des souris soumises à un stress de défaite sociale (n = 11, couleur foncée). Les quantifications sont réalisées sur les deux premières heures (*early phase*) et des quatre dernières heures (*late phase*) de la session de sommeil. **D-F.** Pourcentage (**D**), nombre d'épisodes (**E**) et durée moyenne des épisodes (**F**) de sommeil paradoxal issus de la classification utilisant la combinaison de valeurs fusion 3 s et omission 3 s pour des souris contrôles non-stressées (couleur claire) et des souris soumises à un stress de défaite sociale (couleur foncée). Les quantifications sont réalisées sur les deux premières heures (*early phase*) et des quatre dernières heures (*late phase*) de la session de sommeil. **G-I.** Comme pour D-F. mais pour les valeurs : fusion 10 s et omission 10 s. **J-L.** Comme pour D-F. mais pour les valeurs : fusion 45 s et omission 15 s. **M-O.** Comme pour D-F. mais pour les valeurs : fusion 10 s et omission 40 s. **P-R.** Comme pour D-F. mais pour les valeurs : fusion 45 s et omission 40 s.

Au cours de la phase initiale, seule la combinaison de valeurs de fusion et d'omission à 3 s ne parvient pas à capturer la diminution de la durée des épisodes de sommeil paradoxal induite par la défaite sociale par rapport à la condition contrôle (test des rangs de Wilcoxon entre les conditions contrôle et défaite sociale pendant la phase initiale : manuelle : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge3-drop3 : ranks value=115, p=0.0762 ; merge10-drop10 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge45-drop15 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge10-drop40 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; merge45-drop40 : zval=3.8667, p=1.1034e-04 ; Fig. 4C,F,I,L,O,R). Et, à l'inverse, seule la combinaison de valeurs de fusion et d'omission à 10s parvient à reproduire la diminution de la durée des épisodes après SDS par rapport à la condition contrôle au cours de la phase tardive (test des rangs de Wilcoxon entre les conditions contrôle et défaite sociale pendant la phase tardive : manuelle : zval=2.9842, p=0.0028 ; merge3-drop3 : zval=2.2719, p=0.0231 ; merge10-drop10 : zval=2.9836, p=0.0028 ; merge45-drop15 : zval=0.7391, p=0.4599 ; merge10-drop40 : zval=1.5055, p=0.1322 ; merge45-drop40 : zval=-2.2172, p=0.0266 ; **Fig. 6.5C,F,I,L,O,R**).

Finalement, ces résultats montrent qu'il s'agit de la combinaison de valeurs de fusion et d'omission à 10 s qui capture le mieux les différences observées à l'issue de la classification manuelle entre le groupe contrôle et le groupe de souris soumises à la défaite sociale. Plus précisément, c'est la seule combinaison de valeurs de fusion et d'omission qui parvient à reproduire la fragmentation induite par la défaite sociale en phase tardive de la session de sommeil (voir Chapitre 4).

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que notre nouvelle méthode de classification automatique du sommeil s'applique à différents types de données et est en mesure de capturer des changements fins de l'architecture du sommeil paradoxal, comme une fragmentation de longue durée qui a été associée aux symptômes de stress post-traumatique (Mellman et al., 2002 ; Riemann et al., 2012). De plus, nous montrons que l'utilisation d'une combinaison de valeurs de fusion et d'omission dans un intervalle de valeurs proche de 10 s semble être optimale pour réaliser la classification. Ces critères objectifs dont la valeur peut être gardée en mémoire et réutilisée, permettant ainsi de pallier la subjectivité induite par les classifications manuelles. L'ensemble de ces points sera davantage abordé dans la discussion générale (section 7.1 considérations méthodologiques). En outre, il pourrait être intéressant de tester la robustesse de cette méthode sur des données impliquant des perturbations du sommeil paradoxal différentes, comme sur des souris narcoleptiques, par exemple.

Chapitre 7 : Discussion générale

La relation entre stress et sommeil est complexe. L'objectif de ma thèse était donc de tenter de comprendre comment et par quels mécanismes le sommeil est influencé par le stress.
Tout d'abord, nous avons mis en évidence qu'un stress aigu par défaite sociale provoque une fragmentation prolongée du sommeil paradoxal. Nous avons identifié un substrat neuronal responsable de cette fragmentation : la voie directe reliant les projections excitatrices du cortex préfrontal aux neurones promoteurs de sommeil du VLPO. En effet, nous avons montré que cette voie est spécifiquement recrutée en condition de stress et que son inhibition résorbe la fragmentation du sommeil paradoxal induite par la défaite sociale. En plus d'être nécessaire, nous avons également révélé que la voie PFC-VLPO était suffisante puisqu'en l'absence de facteur stressant, son activation optogénétique mime la fragmentation du sommeil paradoxal qui est en faveur du sommeil lent. Ensuite, nous avons cherché à identifier, au sein de la forte hétérogénéité cellulaire du VLPO, quelle population neuronale pourrait être le médiateur de ces effets. Nos résultats ont mis en évidence que l'activation des neurones CRH induit une suppression du sommeil paradoxal, favorisant une consolidation du sommeil lent. Cela est cohérent avec l'identification de leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques correspondant à celles des neurones promoteurs du sommeil du VLPO. De plus, nos données indiquent que ces neurones CRH sont la cible privilégiée des projections excitatrices du PFC et seraient également spécifiquement actifs lors d'une situation de stress. Par ailleurs, l'ensemble de nos analyses nous a amenés à optimiser notre méthodologie de classification des états de sommeil afin qu'elle soit plus objective et reproductible.

Néanmoins, ces résultats laissent des questions en suspens. Dans cette discussion générale, nous tenterons donc d'éclaircir le rôle physiologique que pourrait jouer la fragmentation du sommeil paradoxal lors d'un stress et l'importance de la voie PFC-VLPO dans ce processus. Nous examinerons également dans quelles mesures il est possible d'intégrer les neurones CRH en tant qu'effecteurs des effets du stress sur le sommeil observés suite à la défaite sociale aiguë. Plus particulièrement, nous discuterons si le peptide CRH lui-même pourrait être à l'origine d'une signalisation intervenant dans la régulation du sommeil et notamment du sommeil paradoxal. Avant de discuter de ces différents points, nous commencerons par aborder les considérations méthodologiques, en soulignant l'importance d'une classification objective des états de sommeil.

7.1 Considérations méthodologiques : l'importance d'une classification objective des états de sommeil

L'ensemble de mes travaux de thèse a mis l'accent sur l'importance d'analyser systématiquement des paramètres fins du sommeil, en particulier dans des conditions de stress. Nous avons démontré que les indicateurs globaux tels que la quantité ou le temps total de sommeil calculés sur tout un enregistrement ne sont pas des indicateurs suffisants pour évaluer les effets du stress sur le sommeil. En effet, ils peuvent masquer des altérations importantes, bien que plus subtiles, du sommeil. À titre d'exemple, les résultats présentés dans le Chapitre 4 montrent que, si nous nous étions concentrés uniquement sur le pourcentage de sommeil paradoxal, les conclusions auraient été différentes et la fragmentation du sommeil paradoxal n'aurait pas été révélée. Or, comme discuté brièvement dans le Chapitre 6, cette fragmentation pourrait refléter certaines pathologies comme les symptômes de stress post-traumatique, rendant sa détection particulièrement importante.

Bien qu'une grande majorité des études réalise des quantifications détaillées de l'architecture du sommeil, beaucoup de divergences demeurent. En effet, certaines études, incluant la nôtre, rapportent des effets du stress sur la durée des épisodes de sommeil paradoxal alors que d'autres rapportent des effets sur leur nombre (Henderson et al., 2017), malgré des protocoles de stress similaires. Plusieurs facteurs peuvent entrer en considération ; mais une possibilité pouvant expliquer ces différences est la façon dont les paramètres sont choisis pour effectuer la classification des états de vigilance. La méthode de classification la plus répandue dans les études sur le sommeil reste une classification manuelle. Cependant, une problématique de ce type de classification est l'absence de critères et de paramètres objectifs accessibles. De plus, il a été montré que l'homologie de la classification manuelle des états de vigilance sur un même enregistrement entre deux évaluateurs n'est que de 89 % (Bagur et al., 2018), rendant cette méthode susceptible à la subjectivité inter-évaluateur.

Pour l'ensemble de ces raisons, j'ai tenté de mettre au point une nouvelle méthode automatique pour classifier le sommeil au sein de laquelle chaque valeur est objectivement déterminée et peut *a fortiori* être gardée en référence. Cela permet de pouvoir réutiliser les valeurs de chaque paramètre utilisé par la classification pour les appliquer à d'autres

enregistrements réalisés chez la même souris, ou pour reproduire les résultats dans le cas où un autre expérimentateur traite les mêmes données. Finalement, cette approche permettrait de s'affranchir de la part de subjectivité dans l'analyse du sommeil et ainsi permettrait une reproductibilité maximale. Ceci est particulièrement important notamment dans la recherche sur l'interaction entre le stress et le sommeil, où des changements mineurs dans les paramètres ou les facteurs de stress peuvent avoir des conséquences très variées.

7.2 Vers un rôle physiologique de la fragmentation du sommeil paradoxal induite par la voie PFC-VLPO en condition de stress ?

7.2.1 Rôle physiologique de la fragmentation du sommeil paradoxal en condition de stress

Mes travaux de thèse ont mis en évidence, pour la première fois à ma connaissance, qu'un stress aigu par défaite sociale induit une fragmentation tardive et de longue durée du sommeil paradoxal. Ce résultat soulève la question du rôle physiologique et de l'avantage que pourrait conférer cette fragilisation du sommeil paradoxal. Une hypothèse pourrait venir du fait que le sommeil paradoxal est l'état possédant le plus haut seuil de réveil (Dillon et Webb, 1965), rendant les individus particulièrement vulnérables. Ainsi, consacrer de moins longues périodes au sommeil paradoxal constituerait un rôle protecteur. Plusieurs résultats expérimentaux soutiennent cette hypothèse.

Des études antérieures ont examiné les effets du stress sur le sommeil chez les rongeurs, révélant des schémas similaires à ceux observés dans notre recherche. En effet, pendant un stress de contention, les rongeurs montrent une phase d'insomnie transitoire au début de la procédure (Rampin et al., 1991 ; Marinesco et al., 1999). Lorsque les animaux étaient maintenus dans le tube de contention pendant une période suffisante (2-4 heures), ils présentaient des phases de sommeil composées uniquement de sommeil lent, dépourvues de sommeil paradoxal. Ces résultats corroborent nos observations après un stress de défaite sociale. Ils étayent également l'idée que le sommeil paradoxal est évité pendant les périodes de stress, tandis que le sommeil lent est permis. Cependant, une fois libérés du stress de contention, les animaux présentent un rebond significatif et spécifique de sommeil paradoxal, tandis que le sommeil lent reste inchangé (Rampin et al., 1991 ; Marinesco et al., 1999).

Dans nos expériences de défaite sociale, nous n'avons pas observé de rebond spécifique de sommeil paradoxal, probablement dû à la durée de nos enregistrements qui ne permet pas de l'observer. Toutefois, ce rebond a été rapporté dans d'autres études au cours de la phase d'obscurité post-SDS (Henderson et al., 2017 ; Wells et al., 2017). Ensemble, ces résultats indiquent qu'une situation stressante altère tout particulièrement le sommeil paradoxal, voire même l'empêche.

Un parallèle peut être fait avec des situations plus écologiques. En effet, une étude a montré que les proies présentent moins de sommeil paradoxal au cours de la nuit par rapport aux espèces prédatrices (Allison et Cicchetti, 1976). Ces résultats confirment donc que l'idée que le sommeil paradoxal est évité dans des conditions stressantes/menaçantes. En outre, l'analyse de l'architecture du sommeil chez le phoque a mis en évidence que lorsqu'il est en mer, et donc exposé à de potentiels prédateurs, son sommeil paradoxal est fragmenté. Au contraire, lorsqu'il est sur terre, le phoque présente des épisodes de sommeil paradoxal plus longs et consolidés (Lyamin et al., 2018). Ces observations corroborent mes travaux de thèse et l'hypothèse selon laquelle le sommeil paradoxal est un état de vulnérabilité ; ainsi, le fait qu'il soit plus fragilisé en condition de stress/menace permet de pouvoir y faire face.
Cependant, une étude a montré qu'une odeur de prédateur placée dans la cage des souris induit une augmentation du temps total passé en sommeil paradoxal (Tseng et al., 2022). Les auteurs interprètent ces résultats comme un processus adaptatif qui permettrait d'être plus réactif en cas de danger imminent car les souris sont plus rapidement réveillées par l'odeur lorsqu'elles sont en sommeil paradoxal qu'en sommeil lent (Tseng et al., 2022). Ces résultats sont surprenants car de précédentes études ont rapporté que les seuils de réveil entre sommeil lent et paradoxal étaient soit identiques (Hayat et al., 2020), soit plus élevés en sommeil paradoxal qu'en sommeil lent (Rasch et al., 2007 ; Kato et al., 2004). Toutefois, ces différences peuvent s'expliquer par les différentes modalités sensorielles utilisées. Néanmoins, bien que le sommeil paradoxal lors de la présentation d'une odeur de prédateur soit plus présent en termes de quantité, il est, de manière intéressante, également plus fragmenté (Tseng et al., 2022).
L'ensemble de ces résultats suggère que la fragmentation du sommeil paradoxal semble constituer un vrai avantage évolutif. En effet, fragmenter le sommeil paradoxal dans un environnement stressant/menaçant, au lieu de le supprimer complètement, pourrait être une stratégie avantageuse, car elle permet d'établir un équilibre entre les contraintes

environnementales et le besoin de sommeil. D'autre part, elle préserve (voire augmente, cf Tseng et al) la quantité totale de sommeil paradoxal plusieurs heures après le stress et donc les fonctions bénéfiques de cette phase de sommeil.

À l'inverse, certaines études rapportent qu'un stress aigu par défaite sociale induit une augmentation de sommeil, en particulier de sommeil lent, qui peut s'accompagner d'une augmentation plus modérée de sommeil paradoxal. Dans ce cas, les auteurs suggèrent que le sommeil joue un rôle restauratif et lui prêtent une fonction anxiolytique permettant de récupérer de l'événement stressant (Fuji et al., 2019 ; Feng et al., 2020 ; Yu et al., 2022). Ces résultats semblent aller à l'encontre de l'hypothèse précédemment mentionnée, mais également de la vision classique selon laquelle un stress induit une première phase d'augmentation de la vigilance (Sanford et al., 2015). Or, pour l'ensemble de ces études, un protocole de défaite sociale différent est utilisé (Fuji et al., 2019 ; Feng et al., 2020 ; Yu et al., 2022). En effet, comme nous l'avons brièvement mentionné dans l'introduction (Chapitre 3), les auteurs réalisent des phases de conflits plus longues ou répétées à intervalles réguliers. Finalement, le temps de contact, le nombre d'attaques et de potentielles blessures augmentent, faisant de ce protocole un stress probablement plus intense pour les souris. Néanmoins, ces différentes théories (rôle protecteur de la fragmentation du sommeil paradoxal ou aspect restauratif de l'augmentation du sommeil) ne sont pas totalement incompatibles. En effet, on pourrait supposer que lors d'un événement stressant trop intense, l'organisme ne parviendrait pas à y faire face par des stratégies classiques et que le sommeil serait absolument primordial pour récupérer les fonctions mentales et corporelles.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer un dosage de corticostérones chez les souris soumises à notre protocole de défaite sociale afin d'évaluer l'intensité de la réponse au stress. On pourrait s'attendre à observer une augmentation de corticostérones après stress, mais qui soit moins importante que celle rapportée par les études utilisant un protocole plus intense. De la même manière, une comparaison des réponses comportementales dans des tests de stress tels que l'EPM ou l'*open field* serait complémentaire. Cette approche permettrait de valider une dissociation des effets du stress sur le sommeil en fonction de l'intensité du protocole. On pourrait alors envisager une notion de seuil d'intensité à partir duquel on observe soit davantage de sommeil s'il est franchi, soit d'autres changements comme la fragmentation du sommeil paradoxal, si l'intensité du protocole est en-dessous du seuil.

7.2.2 Évaluer l'importance de la voie PFC-VLPO

Au cours de ma thèse, j'ai pu identifier un substrat neuronal sous-jacent à la fragmentation du sommeil paradoxal : la voie PFC-VLPO. Bien que nos résultats, en association avec les études précédemment citées, suggèrent que la voie PFC-VLPO pourrait être à l'origine de ce mécanisme protecteur qui se traduit par la fragmentation du sommeil paradoxal, nous n'en avons pas encore la preuve expérimentale.

Toutefois, nous prévoyons, au sein de l'équipe, d'effectuer des expériences visant, d'une part, à confirmer les hauts seuils de réveil au cours du sommeil paradoxal et, d'autre part, à évaluer le rôle physiologique de la voie PFC-VLPO. Ces expériences consisteraient à tester les seuils de réveil à l'aide de stimuli auditifs délivrés pendant le sommeil (en particulier pendant le sommeil paradoxal) chez des souris contrôles ainsi que chez des souris ayant subi un stress par défaite sociale. Nous nous attendons à observer une réactivité plus importante chez les souris stressées grâce à la fragmentation induite par la défaite sociale. Nous pourrions ensuite réaliser les mêmes expériences chez des souris soumises à la défaite sociale, mais chez lesquelles la voie PFC-VLPO serait chémogénétiquement inhibée. Dans ce cas, nous nous attendons à perdre la réactivité aux sons, confirmant ainsi que la fragmentation du sommeil paradoxal par la voie PFC-VLPO est nécessaire pour permettre une réponse aux dangers et exercer ce rôle évolutif protecteur.

7.2.3 Intégration de la voie PFC-VLPO dans les circuits de régulation du sommeil paradoxal

La modulation des centres du sommeil par des structures de plus haut niveau commence peu à peu à prendre de l'importance dans le domaine de la recherche sur le sommeil (Hong et al., 2023 ; Su et al., 2024). Ici, nous avons caractérisé une voie impliquant le PFC et le VLPO qui joue un rôle dans la fragmentation du sommeil paradoxal en situation de stress.

À premier abord, ces résultats peuvent paraître surprenants étant donné la vision historique du VLPO dans la promotion et le maintien du sommeil lent (voir Chapitre 3). Néanmoins, il a déjà été rapporté que l'activation de neurones promoteurs de sommeil Gal du VLPO peut également moduler de façon importante le sommeil paradoxal (Kroeger et al., 2018). De plus, nous montrons ici que ce sont les projections venant du PFC qui apportent une modulation dépendante du contexte qui se met en place exclusivement dans des situations menaçantes pour apporter une réponse adaptée.

Par ailleurs, le rôle que joue cette voie dans la régulation des états de sommeil en condition de stress semble pouvoir s'intégrer avec ce que l'on sait déjà du circuit englobant le VLPO. En effet, il est concevable que l'activation des neurones promoteurs de sommeil du VLPO, par le PFC, puisse inhiber les neurones MCH de l'hypothalamus latéral actifs pendant le sommeil paradoxal (Cvetkovic et al., 2003), permettant ainsi de lever l'inhibition exercée sur la vlPAG (Luppi et al., 2012) et conduisant à la suppression du sommeil paradoxal (voir Chapitre 1 et discussion Chapitre 4).

7.3 Les neurones CRH du VLPO comme effecteurs de la voie PFC-VLPO dans la fragmentation du sommeil paradoxal

Au cours de ma thèse, nous avons donc étudié, d'une part, le rôle de la voie PFC-VLPO et, d'autre part, le rôle des neurones VLPO^{CRH}.

Pour rappel, nous avons montré que la voie PFC-VLPO est sélectivement recrutée en condition de stress (défaite sociale) afin d'induire une fragmentation du sommeil paradoxal. Cette fragmentation est médiée par des projections monosynaptiques excitatrices du PFC sur le VLPO et est au profit d'une transition vers le sommeil lent. Une seconde partie de ma thèse s'est intéressée plus précisément aux neurones VLPO^{CRH}. Nos résultats révèlent que l'activation chémogénétique de ces neurones supprime le sommeil paradoxal, au profit d'une consolidation du sommeil lent. Dans ce dernier cas, la suppression du sommeil paradoxal lors de l'activation des neurones CRH est tellement forte qu'elle ne nous a pas permis d'observer une potentielle fragmentation de cet état. Il est possible qu'un enregistrement sur une plus longue durée, surpassant la période de diminution drastique de sommeil paradoxal, pourrait dévoiler une fragmentation plus tardive. De plus, une partie des divergences observées entre l'activation de la voie PFC-VLPO et celle des neurones VLPO^{CRH} pourrait également être attribuée à l'utilisation de différentes techniques : l'optotgénétique et la chémogénétique, respectivement. En effet, dans le premier cas, l'activité des neurones est entraînée par la fréquence de stimulation ; tandis que, dans le second cas, les neurones sont rendus plus sensibles aux entrées leur arrivant naturellement.

De manière intéressante, nous montrons que les neurones VLPO^{CRH} possèdent les propriétés des neurones promoteurs de sommeil de cette région (Gallopin et al., 2000 ; 2005 ; Matsuo et al., 2003 ; Saint-Mleux et al., 2004 ; Liu et al., 2010) ; à savoir, la présence d'un LTS et l'inhibition par la noradrénaline. De plus, ces neurones sont spécifiquement ciblés par les

projections monosynaptiques excitatrices du PFC. Ces résultats valident nos précédentes observations concernant l'existence d'une voie PFC-VLPO excitatrice directe et nous ont amené à penser que les neurones VLPO^{CRH} pourraient être les effecteurs, au niveau du VLPO, des perturbations du sommeil paradoxal observées lors de la SDS (voir Chapitre 4). Renforçant cette idée, nous avons montré que, tout comme l'inhibition des neurones du PFC qui projettent au VLPO, l'inhibition des neurones VLPO^{CRH} n'induit aucun effet sur l'architecture du sommeil en condition basale, ce qui suggère que les neurones VLPO^{CRH} pourraient également être sélectivement actifs/recrutés en conditions de stress.

Pour explorer davantage cette hypothèse, une autre doctorante de l'équipe a reproduit les expériences de défaite sociale, afin d'évaluer l'impact sur le sommeil de l'inhibition des neurones VLPO^{CRH}. Bien que préliminaires, les résultats indiquent que l'inhibition de ces neurones après un stress ne mime que partiellement les effets de l'inhibition de la voie PFC-VLPO. En effet, l'inhibition des neurones VLPO^{CRH} restaure les quantités de sommeil paradoxal sur l'ensemble de l'enregistrement en incluant celle de la phase initiale.
Finalement, ces résultats rendent moins évident la possibilité de pouvoir relier les neurones VLPO^{CRH} à la voie PFC-VLPO dont l'inhibition dans les mêmes conditions de stress n'était pas suffisante pour restaurer l'insomnie ni la suppression initiale du sommeil paradoxal. Ceci suggère que les neurones VLPO^{CRH} pourraient être sous le contrôle d'une autre voie parallèle, dont l'action permettrait une régulation des états de vigilance pendant la phase précoce du stress.

Enfin, une autre possibilité permettant d'expliquer les différences entre le rôle de la voie PFC-VLPO et les neurones VLPO^{CRH} est que, comme nous l'avons vu dans le Chapitre 4, le PFC projette également sur d'autres neurones, au sein du VLPO, ne faisant pas partie de la population de neurones promoteurs de sommeil. En outre, les projections du PFC sur ces derniers est de nature inhibitrice. Ces résultats confirment que plusieurs voies de différentes natures coexistent et qu'il est difficile de prévoir l'effet net de leur activation conjointe sur les structures en aval. Davantage d'expériences sont nécessaires, d'une part, pour mieux caractériser le rôle des différentes voies modulatrices du VLPO dans la régulation des états de vigilance et, d'autre part, pour éclaircir quelles sont les populations, au sein du VLPO, qui sont ciblées.

7.4 Potentielle implication du peptide CRH dans les effets du stress sur le sommeil paradoxal

Nos résultats soulèvent également la question du rôle que pourrait jouer le peptide CRH dans la régulation des états de vigilance. En effet, ce peptide est probablement colibéré, avec le GABA, par les neurones $VLPO^{CRH}$ (Chung et al., 2017) ; et pourrait ainsi être à l'origine d'une signalisation parallèle.

Le CRH est connu comme le peptide typique du stress et son rôle important dans le déclenchement de la cascade de l'axe HPA. On pourrait faire l'hypothèse que le CRH potentiellement libéré par les neurones du VLPO pourrait être impliqué dans l'insomnie induite par un stress. Des études ont révélé que le CRH avait un impact sur le sommeil. En effet, des études ont mis en évidence que l'injection intracérébroventriculaire de CRH induit une augmentation de l'éveil, une diminution du sommeil lent et une suppression du sommeil paradoxal (Romanowski et al., 2010). De plus, l'injection intracérébroventriculaire de CRH chez des rats privés de sommeil paradoxal induit un rebond ultérieur d'autant plus important (Marrosu et al., 1990). Ces observations fournissent des preuves que le CRH pourrait agir comme un neurotransmetteur au sein du système nerveux central et notamment dans les circuits neuronaux responsables de l'éveil et du sommeil. De manière intéressante, l'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste du CRH bloque la diminution de sommeil paradoxal initialement induite par le protocole de peur contextuelle chez le rongeur (Yang et al., 2009). Cette étude soutient également l'idée que le CRH pourrait réguler le sommeil paradoxal, en particulier dans des conditions menaçantes. En outre, le CRH semble avoir une influence excitatrice dans plusieurs régions comme le cortex, l'hypothalamus ou le LC (Valentino et al., 1983 ; Eberly et al., 1983). Ceci est particulièrement intéressant car, comme nous l'avons vu dans l'introduction, le LC joue un rôle important dans le contrôle du sommeil paradoxal. En effet, le LC est silencieux pendant le sommeil paradoxal et cette inactivité est considérée comme permissive pour cet état (Steriade et al., 1990). Le CRH pourrait alors activer les neurones du LC et potentiellement supprimer le sommeil paradoxal. Cette hypothèse pourrait paraître surprenante puisque le GABA, qui a des effets antagonistes, est colibéré avec le CRH par les neurones promoteurs de sommeil du VLPO. Toutefois, de précédentes études ont mis en évidence que certains neurones comme les neurones de la VTA peuvent libérer à la fois du glutamate et du GABA vers les neurones de l'habenula latérale (Shabel et al., 2014 ; Root et al., 2014). Finalement, cette hypothèse pourrait offrir une

explication aux effets que nous observons lors des manipulations chémogénétiques des neurones VLPO^{CRH}. Il est possible que des mécanismes de régulation différents soient mis en jeu en fonction du contexte (par exemple, situation stressante), au cours duquel l'un ou l'autre des neurotransmetteurs pourrait prendre le dessus.

Finalement, l'ensemble de ces hypothèses pourraient être confirmées, par exemple, par des expériences de photométrie fibrée pour lesquelles un senseur CRH existe (GRAB CRH sensor, pour *G protein–coupled receptor activation–based*) et permettrait de confirmer s'il est effectivement libéré dans ces régions cibles (comme le LC) au cours de situations stressantes ou basales.

7.5 Fragmentation du sommeil paradoxal et maladies psychiatriques

Les troubles du sommeil sont pratiquement omniprésents parmi les maladies psychiatriques. En particulier, la fragmentation du sommeil paradoxal a été décrite dans les symptômes de stress post-traumatique (PTSD ; Mellman et al., 2002 ; Riemann et al., 2012). D'ailleurs, certaines études suggèrent même que cette fragmentation à la suite d'un traumatisme pourrait prédire le développement d'un PTSD (Mellman et al., 2002 ; Breslau et al., 2004 ; Habukawa et al., 2007). En effet, les victimes d'accidents de la route ayant dormi plus longtemps avec des épisodes de sommeil paradoxal plus consolidés dans la période qui a suivi l'événement traumatique n'ont pas développé de PTSD (Mellman et al., 2002, 2007 ; Mellman et Hipolito, 2006). L'ensemble de ces études suggèrent que détecter la fragmentation du sommeil paradoxal également chez l'humain constitue un enjeu biomédical majeur.

Ils argumentent également en faveur d'une étude approfondie, chez le modèle animal, afin d'en comprendre les mécanismes. De manière intéressante, la défaite sociale chronique n'est pas parvenue à induire une fragmentation de longue durée comme observée chez les patients PTSD (Grafe et al., 2020 ; 2024 ; Gargiulo et al., 2021). En revanche, notre étude, utilisant la défaite sociale aiguë, semble reproduire ce symptôme. Il serait donc intéressant d'analyser le sommeil sur de plus longues périodes (plusieurs jours contigus) pour voir à quel point cette fragmentation du sommeil paradoxal persiste, ce qui offrirait une piste de modèle de PTSD. De plus, nos résultats fournissent un substrat biologique à cette fragmentation, offrant donc une première brique pour des pistes d'action à la recherche de potentielles thérapies.

Conclusion générale

En conclusion, les travaux que je vous ai présentés mettent en lumière, pour la première fois, qu'un stress aigu par défaite sociale induit une fragmentation du sommeil paradoxal de longue durée. Ces résultats reflètent un des symptômes souvent rapportés chez les patients atteints de troubles de stress post-traumatiques et soulignent l'importance de prêter une attention particulière aux brèves périodes de sommeil paradoxal, en particulier lors de situations stressantes. En outre, mes travaux de thèse ont permis d'identifier un substrat neuronal responsable de cette fragmentation : les projections du cortex préfrontal aux neurones promoteurs de sommeil du VLPO. Il n'est pas encore clair de savoir quelle population, parmi les neurones promoteurs de sommeil du VLPO, est la médiatrice de cette fragmentation. Les neurones exprimant le peptide CRH semblent être un bon candidat. En effet, nous avons montré qu'ils sont sélectivement recrutés en cas de stress afin de diminuer drastiquement le sommeil paradoxal. En revanche, ils ne semblent pas jouer sur la fragmentation de cet état. Ces résultats suggèrent qu'il existe probablement d'autres voies parallèles mises en jeu afin de réguler, de la manière la plus adaptée, l'architecture du sommeil lorsqu'un individu est en danger.

Finalement, l'ensemble de ces travaux soulève la question du rôle physiologique de la fragmentation du sommeil paradoxal à un individu. Une possibilité réside dans le fait que le sommeil paradoxal est un état de grande vulnérabilité puisque le seuil d'éveil est le plus élevé. Ainsi, raccourcir le temps passé dans cet état permettrait d'être plus réactif et prêt à affronter un danger. Tout cela peut se produire sans pour autant supprimer la quantité totale de sommeil indispensable à la survie.

Bibliographie

Adam, K., & Oswald, I. (1977). Sleep is for tissue restoration. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, *11*(4), 376.

Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K., & De Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, *450*(7168), 420-424.

Adamantidis, A., Salvert, D., Goutagny, R., Lakaye, B., Gervasoni, D., Grisar, T., ... & Fort, P. (2008). Sleep architecture of the melanin–concentrating hormone receptor 1–knockout mice. *European journal of neuroscience*, *27*(7), 1793-1800.

Adrien, J., Dugovic, C., & Martin, P. (1991). Sleep-wakefulness patterns in the helpless rat. *Physiology & Behavior*, *49*(2), 257-262.

Amat, J., Paul, E., Zarza, C., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2006). Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, *26*(51), 13264-13272.

Anaclet, C., Lin, J. S., Vetrivelan, R., Krenzer, M., Vong, L., Fuller, P. M., & Lu, J. (2012). Identification and characterization of a sleep-active cell group in the rostral medullary brainstem. *Journal of Neuroscience*, *32*(50), 17970-17976.

Alam, M. A., Kumar, S., McGinty, D., Alam, M. N., & Szymusiak, R. (2014). Neuronal activity in the preoptic hypothalamus during sleep deprivation and recovery sleep. *Journal of neurophysiology*, *111*(2), 287-299.

Allison, T., & Cicchetti, D. V. (1976). Sleep in mammals: ecological and constitutional correlates. *Science*, *194*(4266), 732-734.

Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nature neuroscience*, *8*(3), 365-371.

Anaclet, C., Pedersen, N. P., Ferrari, L. L., Venner, A., Bass, C. E., Arrigoni, E., & Fuller, P. M. (2015). Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms. *Nature communications*, *6*(1), 8744.

Anaclet, C., & Fuller, P. M. (2017). Brainstem regulation of slow-wave-sleep. *Current opinion in neurobiology*, *44*, 139-143.

Anafi, R. C., Kayser, M. S., & Raizen, D. M. (2019). Exploring phylogeny to find the function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(2), 109-116.

Antila, H., Kwak, I., Choi, A., Pisciotti, A., Covarrubias, I., Baik, J., ... & Chung, S. (2022). A noradrenergic-hypothalamic neural substrate for stress-induced sleep disturbances. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(45), e2123528119.

Arnsten, A. F., Raskind, M. A., Taylor, F. B., & Connor, D. F. (2015). The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. *Neurobiology of stress*, *1*, 89-99.

Arrigoni, E., Lu, J., Vetrivelan, R., & Saper, C. B. (2009). Long–term synaptic plasticity is impaired in rats with lesions of the ventrolateral preoptic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, *30*(11), 2112-2120.

Arrigoni, E., & Fuller, P. M. (2022). The sleep-promoting ventrolateral preoptic nucleus: what have we learned over the past 25 years?. *International journal of molecular sciences*, *23*(6), 2905.

Aston-Jones, G., & Bloom, F. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *Journal of Neuroscience*, *1*(8), 876-886.

Aston–Jones, G., & Cohen, J. D. (2005). Adaptive gain and the role of the locus coeruleus–norepinephrine system in optimal performance. *Journal of Comparative Neurology*, *493*(1), 99-110.

Badia, P., Harsh, J., & Abbott, B. (1979). Choosing between predictable and unpredictable shock conditions: Data and theory. *Psychological Bulletin*, *86*(5), 1107.

Bagur, S., Lacroix, M. M., de Lavilléon, G., Lefort, J. M., Geoffroy, H., & Benchenane, K. (2018). Harnessing olfactory bulb oscillations to perform fully brain-based sleep-scoring and real-time monitoring of anaesthesia depth. *PLoS biology*, *16*(11), e2005458.

Batini, C., Moruzzi, G., Palestini, M., Rossi, G. F., & Zanchetti, A. (1958). Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science*, *128*(3314), 30-32.

Baracchi, F., & Opp, M. R. (2009). Cytokines, Immunity and Sleep. *The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders*, 209-233.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limiroli, E., Panerai, A. E., Ceresini, G., ... & Parmigiani, S. (2001). Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. *Physiology & behavior*, *73*(3), 401-410.

Berger, H. (1929). Über das elektroenkephalogramm des menschen. *Archiv für psychiatrie und nervenkrankheiten*, *87*(1), 527-570.

Bernard, C. (1865). Du progrès dans les sciences physiologiques. *Revue des Deux Mondes (1829-1971)*, *58*(3), 640-663.

Berton, O., Durand, M., Aguerre, S., Mormède, P., & Chaouloff, F. (1999). Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. *Neuroscience*, *92*(1), 327-341.

Berton, O., McClung, C. A., DiLeone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., ... & Nestler, E. J. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, *311*(5762), 864-868.

Besedovsky, L., Lange, T., & Born, J. (2012). Sleep and immune function. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *463*(1), 121-137.

Bland, S. K., & Bland, B. H. (1986). Medial septal modulation of hippocampal theta cell discharges. *Brain research*, *375*(1), 102-116.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M. H., Barbagli, B., Fort, P., & 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), 1959-1973.

Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B., & Luppi, P. H. (2003). Localization of the GABAergic and non–GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *European Journal of Neuroscience*, *18*(6), 1627-1639.

Borbély, A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Hum neurobiol*, *1*(3), 195-204.

Boucetta, S., Cissé, Y., Mainville, L., Morales, M., & Jones, B. E. (2014). Discharge profiles across the sleep–waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *Journal of Neuroscience*, *34*(13), 4708-4727.

Booth, V., & Behn, C. G. D. (2014). Physiologically-based modeling of sleep–wake regulatory networks. *Mathematical biosciences*, *250*, 54-68.

Branch, A. F., Navidi, W., Tabuchi, S., Terao, A., Yamanaka, A., Scammell, T. E., & Diniz Behn, C. (2016). Progressive loss of the orexin neurons reveals dual effects on wakefulness. *Sleep*, *39*(2), 369-377.

Braun, A. R., Balkin, T. J., Wesenten, N. J., Carson, R. E., Varga, M., Baldwin, P., ... & Herscovitch, P. (1997). Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H2 (15) O PET study. *Brain: a journal of neurology*, *120*(7), 1173-1197.

Breslau, N., Lucia, V. C., & Davis, G. C. (2004). Partial PTSD versus full PTSD: an empirical examination of associated impairment. *Psychological medicine*, *34*(7), 1205-1214.

Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological reviews*.

Cannon, W. B. (1914). The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *33*(2), 356-372.

Cannon, W. B. (1915). Alternative satisfactions for the fighting emotions.

Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological reviews*, *9*(3), 399-431.

Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex?. *Science*, *358*(6362), 478-482.

Carter, M. E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., ... & De Lecea, L. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nature neuroscience*, *13*(12), 1526-1533.

Cassens, G., Kuruc, A., Roffman, M., Orsulak, P. J., & Schildkraut, J. J. (1981). Alterations in brain norepinephrine metabolism and behavior induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Behavioural brain research*, *2*(3), 387-407.

Cespuglio, R., Faradji, H., Gomez, M. E., & Jouvet, M. (1981). Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats. *Neuroscience letters*, *24*(2), 133-138.

Chang, C. H., Chen, M. C., Qiu, M. H., & Lu, J. (2014). Ventromedial prefrontal cortex regulates depressive-like behavior and rapid eye movement sleep in the rat. *Neuropharmacology*, *86*, 125-132.

Chauveau, F., Claverie, D., Lardant, E., Varin, C., Hardy, E., Walter, A., ... & Rancillac, A. (2020). Neuropeptide S promotes wakefulness through the inhibition of sleep-promoting ventrolateral preoptic nucleus neurons. *Sleep*, *43*(1), zsz189.

Chee, M. J., Arrigoni, E., & Maratos-Flier, E. (2015). Melanin-concentrating hormone neurons release glutamate for feedforward inhibition of the lateral septum. *Journal of Neuroscience*, *35*(8), 3644-3651.

Cheeta, S., Ruigt, G., van Proosdij, J., & Willner, P. (1997). Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biological psychiatry*, *41*(4), 419-427.

Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., ... & Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, *98*(4), 437-451.

Chen, L., Yin, D., Wang, T. X., Guo, W., Dong, H., Xu, Q., ... & Huang, Z. L. (2016). Basal forebrain cholinergic neurons primarily contribute to inhibition of electroencephalogram delta activity, rather than inducing behavioral wakefulness in mice. *Neuropsychopharmacology*, *41*(8), 2133-2146.

Chen, P., Lou, S., Huang, Z. H., Wang, Z., Shan, Q. H., Wang, Y., ... & Zhou, J. N. (2020). Prefrontal cortex corticotropin-releasing factor neurons control behavioral style selection under challenging situations. *Neuron*, *106*(2), 301-315.

Chou, T. C., Bjorkum, A. A., Gaus, S. E., Lu, J., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2002). Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *Journal of Neuroscience*, *22*(3), 977-990.

Chu, N. S., & Bloom, F. E. (1974). Activity patterns of catecholamine–containing pontine neurons in the dorso–lateral tegmentum of unrestrained cats. *Journal of Neurobiology*, *5*(6), 527-544.

Chung, S., Weber, F., Zhong, P., Tan, C. L., Nguyen, T. N., Beier, K. T., ... & Dan, Y. (2017). Identification of preoptic sleep neurons using retrograde labelling and gene profiling. *Nature*, *545*(7655), 477-481.

Cirelli, C., Pompeiano, M., & Tononi, G. (1995). Sleep deprivation and c–fos expression in the rat brain. *Journal of sleep research*, *4*(2), 92-106.

Clément, O., Sapin, E., Bérod, A., Fort, P., & Luppi, P. H. (2011). Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep*, *34*(4), 419-423.

Clément, O., Sapin, E., Libourel, P. A., Arthaud, S., Brischoux, F., Fort, P., & Luppi, P. H. (2012). The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. *Journal of Neuroscience*, *32*(47), 16763-16774.

Contreras, D., & Steriade, M. (1995). Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. *Journal of Neuroscience*, *15*(1), 604-622.

Cvetkovic, V., Brischoux, F., Griffond, B., Bernard, G., Jacquemard, C., Fellmann, D., & Risold, P. Y. (2003). Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons supplying both cortical and neuroendocrine projections. *Neuroscience*, *116*(1), 31-35.

Daan, S., Beersma, D. G., & Borbély, A. A. (1984). Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *246*(2), R161-R183.

Dahan, L., Astier, B., Vautrelle, N., Urbain, N., Kocsis, B., & Chouvet, G. (2007). Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology*, *32*(6), 1232-1241.

De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews neuroscience*, *6*(6), 463-475.

Del Arco, A., Park, J., & Moghaddam, B. (2020). Unanticipated stressful and rewarding experiences engage the same prefrontal cortex and ventral tegmental area neuronal populations. *eneuro*, *7*(3).

de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X. B., Foye, P. E., Danielson, P. E., ... & Sutcliffe, J. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(1), 322-327.

Dement, W., & Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, *9*(4), 673-690.

Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature reviews neuroscience*, *11*(2), 114-126.

Dickerson, S. S., & Kemeny, M. E. (2004). Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological bulletin*, *130*(3), 355.

Dillon, R. F., & Webb, W. B. (1965). Threshold of arousal from" activated" sleep in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *59*(3), 446.

Diniz Behn, C. G., Ananthasubramaniam, A., & Booth, V. (2013). Contrasting existence and robustness of rem/non-rem cycling in physiologically based models of rem sleep regulatory networks. *SIAM Journal on Applied Dynamical Systems*, *12*(1), 279-314.

Dunmyre, J. R., Mashour, G. A., & Booth, V. (2014). Coupled flip-flop model for REM sleep regulation in the rat. *PLoS One*, *9*(4), e94481.

Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W. J., Jones, J. R., & De Lecea, L. (2016). VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep–wake behaviors. *Nature neuroscience*, *19*(10), 1356-1366.

Eberly, L. B., Dudley, C. A., & Moss, R. L. (1983). Iontophoretic mapping of corticotropin-releasing factor (CRF) sensitive neurons in the rat forebrain. *Peptides*, *4*(6), 837-841.

Economo, C. V. (1926). Eine neue Art Spezialzellen des Lobus cinguli und Lobus insulae. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, *100*(1), 706-712.

Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, *76*(6), 1057-1070.

Everson, C. A. (1995). Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behavioural brain research*, *69*(1-2), 43-54.

Feng, X., Zhao, H. Y., Shao, Y. J., Lou, H. F., Zhu, L. Y., Duan, S., & Yu, Y. Q. (2020). Anxiolytic effect of increased NREM sleep after acute social defeat stress in mice. *Neuroscience Bulletin*, *36*, 1137-1146.

Ferris, M. J., España, R. A., Locke, J. L., Konstantopoulos, J. K., Rose, J. H., Chen, R., & Jones, S. R. (2014). Dopamine transporters govern diurnal variation in extracellular dopamine tone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(26), E2751-E2759.

Fort, P., Sakai, K., Luppi, P. H., Salvert, D., & Jouvet, M. (1989). Monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat facial nucleus as evidenced by a double immunostaining method with unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer. *Journal of Comparative Neurology*, *283*(2), 285-302.

Fort, P., Luppi, P. H., & Jouvet, M. (1993). Glycine-immunoreactive neurones in the cat brain stem reticular formation. *Neuroreport*, *4*(9), 1123-1126.

Fort, P., Bassetti, C. L., & Luppi, P. H. (2009). Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *European Journal of Neuroscience*, *29*(9), 1741-1753.

Fraigne, J. J., Luppi, P. H., Mahoney, C. E., De Luca, R., Shiromani, P. J., Weber, F., ... & Peever, J. (2023). Dopamine neurons in the ventral tegmental area modulate rapid eye movement sleep. *Sleep*, *46*(8), zsad024.

Franken, P., Chollet, D., & Tafti, M. (2001). The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *Journal of Neuroscience*, *21*(8), 2610-2621.

Franken, P. (2002). Long–term vs. short–term processes regulating REM sleep. *Journal of sleep research*, *11*(1), 17-28.

Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, *75*(5), 747-761.

Fujii, S., Kaushik, M. K., Zhou, X., Korkutata, M., & Lazarus, M. (2019). Acute social defeat stress increases sleep in mice. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 322.

Fuller, P., Sherman, D., Pedersen, N. P., Saper, C. B., & Lu, J. (2011). Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *Journal of Comparative Neurology*, *519*(5), 933-956.

Fuster, J. M. (1997). The prefrontal cortex-Anatomy. *Physiology and neuropsychology of the frontal lobe*, 6-11.

Fuster, J. M. (2001). The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron*, *30*(2), 319-333.

Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P. H., Rossier, J., ... & Serafin, M. (2000). Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature*, *404*(6781), 992-995.

Gallopin, T., Luppi, P. H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O. E. E. A., ... & 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), 1377-1390.

Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A., & Saper, C. B. (2002). Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience*, *115*(1), 285-294.

George, R., Haslett, W. L., & Jenden, D. J. (1964). A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *International journal of neuropharmacology*, *3*(6), 541-IN1.

Gerashchenko, D., Salin-Pascual, R., & Shiromani, P. J. (2001). Effects of hypocretin–saporin injections into the medial septum on sleep and hippocampal theta. *Brain research*, *913*(1), 106-115.

Gerashchenko, D., Wisor, J. P., Burns, D., Reh, R. K., Shiromani, P. J., Sakurai, T., ... & Kilduff, T. S. (2008). Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(29), 10227-10232.

Gervasoni, D., Peyron, C., Rampon, C., Barbagli, B., Chouvet, G., Urbain, N., ... & Luppi, P. H. (2000). Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience*, *20*(11), 4217-4225.

Goforth, P. B., Leinninger, G. M., Patterson, C. M., Satin, L. S., & Myers, M. G. (2014). Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *Journal of neuroscience*, *34*(34), 11405-11415.

Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Beitia, G., Vegas, O., Azpiroz, A., & Garmendia, L. (2011). Individual differences in chronically defeated male mice: behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress. *Stress*, *14*(5), 537-548.

Gong, H., Szymusiak, R., King, J., Steininger, T., & McGinty, D. (2000). Sleep-related c-Fos protein expression in the preoptic hypothalamus: effects of ambient warming. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, *279*(6), R2079-R2088.

Goyens, J., & Noirot, E. (1975). Effects of cohabitation with females on aggressive behavior between male mice. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, *8*(1), 79-84.

Grace, K. P., & Horner, R. L. (2015). Evaluating the evidence surrounding pontine cholinergic involvement in REM sleep generation. *Frontiers in neurology*, *6*, 190.

Grandner, M. A., Hale, L., Moore, M., & Patel, N. P. (2010). Mortality associated with short sleep duration: the evidence, the possible mechanisms, and the future. *Sleep medicine reviews*, *14*(3), 191-203.

Grafe, L. A., O'Mara, L., Branch, A., Dobkin, J., Luz, S., Vigderman, A., ... & Bhatnagar, S. (2020). Passive coping strategies during repeated social defeat are associated with long-lasting changes in sleep in rats. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *14*, 6.

Grafe, L., Miller, K. E., Ross, R. J., & Bhatnagar, S. (2024). The importance of REM sleep fragmentation in the effects of stress on sleep: Perspectives from preclinical studies. *Neurobiology of Stress*, *28*, 100588.

Gargiulo, A. T., Jasodanand, V., Luz, S., O'Mara, L., Kubin, L., Ross, R. J., ... & Grafe, L. A. (2021). Sex differences in stress-induced sleep deficits. *Stress*, *24*(5), 541-550.

Gvilia, I., Turner, A., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Preoptic area neurons and the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep. *Journal of Neuroscience*, *26*(11), 3037-3044.

Habukawa, M., Uchimura, N., Maeda, M., Kotorii, N., & Maeda, H. (2007). Sleep findings in young adult patients with posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, *62*(10), 1179-1182.

Hagenaars, M. A., Oitzl, M., & Roelofs, K. (2014). Updating freeze: aligning animal and human research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *47*, 165-176.

Hasegawa, E., Yanagisawa, M., Sakurai, T., & Mieda, M. (2014). Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways. *The Journal of clinical investigation*, *124*(2), 604-616.

Hasegawa, E., Miyasaka, A., Sakurai, K., Cherasse, Y., Li, Y., & Sakurai, T. (2022). Rapid eye movement sleep is initiated by basolateral amygdala dopamine signaling in mice. *Science*, *375*(6584), 994-1000.

Hassani, O. K., Lee, M. G., Henny, P., & Jones, B. E. (2009). Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep–wake cycle. *Journal of Neuroscience*, *29*(38), 11828-11840.

Hayashi, Y., Kashiwagi, M., Yasuda, K., Ando, R., Kanuka, M., Sakai, K., & Itohara, S. (2015). Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science*, *350*(6263), 957-961.

Hayat, H., Regev, N., Matosevich, N., Sales, A., Paredes-Rodriguez, E., Krom, A. J., ... & Nir, Y. (2020). Locus coeruleus norepinephrine activity mediates sensory-evoked awakenings from sleep. *Science advances*, *6*(15), eaaz4232.

Heimer, L., & Alheid, G. F. (1991). Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *The basal forebrain: anatomy to function*, 1-42.

Henderson, F., Vialou, V., El Mestikawy, S., & Fabre, V. (2017). Effects of social defeat stress on sleep in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *11*, 227.

Héricé, C., Patel, A. A., & Sakata, S. (2019). Circuit mechanisms and computational models of REM sleep. *Neuroscience research*, *140*, 77-92.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews neuroscience*, *11*(7), 503-513.

Hobson, J. A., McCarley, R. W., Pivik, R. T., & Freedman, R. (1974). Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. *Journal of Neurophysiology*, *37*(3), 497-511.

Hobson, J. A., McCarley, R. W., & Wyzinski, P. W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, *189*(4196), 55-58.

Hollis, F., Wang, H., Dietz, D., Gunjan, A., & Kabbaj, M. (2010). The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague–Dawley rats. *Psychopharmacology*, *211*, 69-77.

Hollis, F., & Kabbaj, M. (2014). Social defeat as an animal model for depression. *ILAR journal*, *55*(2), 221-232.

Holmes, A., & Wellman, C. L. (2009). Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *33*(6), 773-783.

Hong, J., Lozano, D. E., Beier, K. T., Chung, S., & Weber, F. (2023). Prefrontal cortical regulation of REM sleep. *Nature Neuroscience*, *26*(10), 1820-1832.

Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function*, *212*, 149-179.

Huhman, K. L., Solomon, M. B., Janicki, M., Harmon, A. C., Lin, S. M., Israel, J. E., & Jasnow, A. M. (2003). Conditioned defeat in male and female Syrian hamsters. *Hormones and behavior*, *44*(3), 293-299.

Huhman, K. L. (2006). Social conflict models: can they inform us about human psychopathology?. *Hormones and behavior*, *50*(4), 640-646.

Hur, E. E., & Zaborszky, L. (2005). Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology*, *483*(3), 351-373.

Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M., & Saper, C. B. (1991). Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *308*(2), 249-276.

Imeri, L., & Opp, M. R. (2009). How (and why) the immune system makes us sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(3), 199-210.

Ito, H., Yanase, M., Yamashita, A., Kitabatake, C., Hamada, A., Suhara, Y., ... & Narita, M. (2013). Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. *Molecular brain*, *6*, 1-10.

Itoi, K., & Sugimoto, N. (2010). The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *Journal of neuroendocrinology*, *22*(5), 355-361.

Jego, S., Glasgow, S. D., Herrera, C. G., Ekstrand, M., Reed, S. J., Boyce, R., ... & Adamantidis, A. R. (2013). Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nature neuroscience*, *16*(11), 1637-1643.

Jennings, J. H., Ung, R. L., Resendez, S. L., Stamatakis, A. M., Taylor, J. G., Huang, J., ... & Stuber, G. D. (2015). Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*, *160*(3), 516-527.

Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews neuroscience*, *10*(6), 459-466.

Jouvet, M., Michel, F., & Courjon, J. (1959). Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *CR Soc Biol*, *153*, 1024-1028.

Jouvet, M. (1962). Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep. *Archives italiennes de biologie*, *100*, 125-206.

Jouvet, M. (1972). Some monoaminergic mechanisms controlling sleep and waking. In *Brain and human behavior* (pp. 131-161). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Kaitin, K. I. (1984). Preoptic area unit activity during sleep and wakefulness in the cat. *Experimental neurology*, *83*(2), 347-357.

Kamphuis, J., Lancel, M., Koolhaas, J. M., & Meerlo, P. (2015). Deep sleep after social stress: NREM sleep slow-wave activity is enhanced in both winners and losers of a conflict. *Brain, behavior, and immunity*, *47*, 149-154.

Killgore, W. D. (2010). Effects of sleep deprivation on cognition. *Progress in brain research*, *185*, 105-129.

Kroeger, D., Absi, G., Gagliardi, C., Bandaru, S. S., Madara, J. C., Ferrari, L. L., ... & Vetrivelan, R. (2018). Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nature communications*, *9*(1), 4129.

Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews*, *89*(2), 535-606.

Lacroix, M. M., de Lavilléon, G., Lefort, J., El Kanbi, K., Bagur, S., Laventure, S., ... & Benchenane, K. (2018). Improved sleep scoring in mice reveals human-like stages. *BioRxiv*, 489005.

Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. (2018). What, if anything, is rodent prefrontal cortex?. *eneuro*, *5*(5).

Le Bon, O. (2021). An asymmetrical hypothesis for the NREM-REM sleep alternation—What is the NREM-REM cycle?. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 627193.

LeDoux, J. E., & Phelps, E. A. (1993). Emotional networks in the brain. *Handbook of emotions*, *109*, 118.

Lee, M. G., Hassani, O. K., & Jones, B. E. (2005). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *Journal of Neuroscience*, *25*(28), 6716-6720.

Liang, Y., Shi, W., Xiang, A., Hu, D., Wang, L., & Zhang, L. (2021). The NAergic locus coeruleus-ventrolateral preoptic area neural circuit mediates rapid arousal from sleep. *Current Biology*, *31*(17), 3729-3742.

Lim, A. S., Ellison, B. A., Wang, J. L., Yu, L., Schneider, J. A., Buchman, A. S., ... & Saper, C. B. (2014). Sleep is related to neuron numbers in the ventrolateral preoptic/intermediate nucleus in older adults with and without Alzheimer's disease. *Brain*, *137*(10), 2847-2861.

Lin, J. S., Sakai, K., & Jouvet, M. (1988). Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology*, *27*(2), 111-122.

Lin, J. S., Sakai, K., & Jouvet, M. (1994). Hypothalamo–preoptic histaminergic projections in sleep–wake control in the cat. *European Journal of Neuroscience*, *6*(4), 618-625.

Liu, Z. W., Faraguna, U., Cirelli, C., Tononi, G., & Gao, X. B. (2010). Direct evidence for wake-related increases and sleep-related decreases in synaptic strength in rodent cortex. *Journal of Neuroscience*, *30*(25), 8671-8675.

Liu, S., Lamaze, A., Liu, Q., Tabuchi, M., Yang, Y., Fowler, M., ... & Wu, M. N. (2014). WIDE AWAKE mediates the circadian timing of sleep onset. *Neuron*, *82*(1), 151-166.

Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. (1935). Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science*, *81*(2111), 597-598.

Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. (1936). Electrical potentials of the human brain. *Journal of experimental Psychology*, *19*(3), 249.

Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart III, G. A. (1938). Distribution of disturbance-patterns in the human electroencephalogram, with special reference to sleep. *Journal of neurophysiology*, *1*(5), 413-430.

Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *Journal of Neuroscience*, *20*(10), 3830-3842.

Lu, J., Sherman, D., Devor, M., & Saper, C. B. (2006). A putative flip–flop switch for control of REM sleep. *Nature*, *441*(7093), 589-594.

Luo, M., Fei, X., Liu, X., Jin, Z., Wang, Y., & Xu, M. (2023). Divergent neural activity in the VLPO during anesthesia and sleep. *Advanced Science*, *10*(2), 2203395.

Luppi, P. H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D., & 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. *Journal of Comparative Neurology*, *277*(1), 1-20.

Luppi, P. H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G., & 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), 119-160.

Luppi, P. H., Gervasoni, D., Boissard, R., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., ... & Fort, P. (2004). Brainstem structures responsible for paradoxical sleep onset and maintenance. *Archives italiennes de biologie*, *142*(4), 397-411.

Luppi, P. H., Clement, O., Sapin, E., Peyron, C., Gervasoni, D., Léger, L., & Fort, P. (2012). Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *463*, 43-52.

Luppi, P. H., Chancel, A., Malcey, J., Cabrera, S., Fort, P., & Maciel, R. M. (2024). Which structure generates paradoxical (REM) sleep: The brainstem, the hypothalamus, the amygdala or the cortex?. *Sleep Medicine Reviews*, 101907.

Lyamin, O. I., Kosenko, P. O., Korneva, S. M., Vyssotski, A. L., Mukhametov, L. M., & Siegel, J. M. (2018). Fur seals suppress REM sleep for very long periods without subsequent rebound. *Current Biology*, *28*(12), 2000-2005.

Kant, G. J., Pastel, R. H., Bauman, R. A., Meininger, G. R., Maughan, K. R., Robinson III, T. N., ... & Covington, P. S. (1995). Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiology & behavior*, *57*(2), 359-365.

Kask, K., Langel, Ü., & Bartfai, T. (1995). Galanin—a neuropeptide with inhibitory actions. *Cellular and molecular neurobiology*, *15*, 653-673.

Kostin, A., Alam, M. A., Saevskiy, A., Yang, C., Golshani, P., & Alam, M. N. (2023). Calcium Dynamics of the Ventrolateral Preoptic GABAergic Neurons during Spontaneous Sleep-Waking and in Response to Homeostatic Sleep Demands. *International journal of molecular sciences*, *24*(9), 8311.

Kato, T., Montplaisir, J. Y., & Lavigne, G. J. (2004). Experimentally induced arousals during sleep: a cross–modality matching paradigm. *Journal of sleep research*, *13*(3), 229-238.

Koyama, Y., & Hayaishi, O. (1994). Firing of neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rat: its possible involvement in slow wave sleep and paradoxical sleep. *Neuroscience research*, *19*(1), 31-38.

Kroeger, D., Ferrari, L. L., Petit, G., Mahoney, C. E., Fuller, P. M., Arrigoni, E., & Scammell, T. E. (2017). Cholinergic, glutamatergic, and GABAergic neurons of the pedunculopontine tegmental nucleus have distinct effects on sleep/wake behavior in mice. *Journal of Neuroscience*, *37*(5), 1352-1366.

Kroeger, D., Absi, G., Gagliardi, C., Bandaru, S. S., Madara, J. C., Ferrari, L. L., ... & Vetrivelan, R. (2018). Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nature communications*, *9*(1), 4129.

Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V., & Koryakina, L. A. (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology biochemistry and behavior*, *38*(2), 315-320.

Kupfer, D. J., Frank, E., Perel, J. M., Cornes, C., Mallinger, A. G., Thase, M. E., ... & Grochocinski, V. J. (1992). Five-year outcome for maintenance therapies in recurrent depression. *Archives of General Psychiatry*, *49*(10), 769-773.

Ma, Y., Miracca, G., Yu, X., Harding, E. C., Miao, A., Yustos, R., ... & Wisden, W. (2019). Galanin neurons unite sleep homeostasis and α2-adrenergic sedation. *Current Biology*, *29*(19), 3315-3322.

Machida, M., Yang, L., Wellman, L. L., & Sanford, L. D. (2013). Effects of stressor predictability on escape learning and sleep in mice. *Sleep*, *36*(3), 421-430.

Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(4-5), 829-841.

Maloney, K. J., Mainville, L., & 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. *Journal of Neuroscience*, *19*(8), 3057-3072.

Maloney, K. J., Mainville, L., & 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. *Journal of Neuroscience*, *20*(12), 4669-4679.

Mander, B. A., Rao, V., Lu, B., Saletin, J. M., Lindquist, J. R., Ancoli-Israel, S., ... & Walker, M. P. (2013). Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging. *Nature neuroscience*, *16*(3), 357-364.

Manns, I. D., Mainville, L., & Jones, B. E. (2001). Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience*, *107*(2), 249-263.

Maquet, P., Péters, J. M., Aerts, J., Delfiore, G., Degueldre, C., Luxen, A., & Franck, G. (1996). Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature*, *383*(6596), 163-166.

Marieb, E. N., & Hoehn, K. (2007). *Human anatomy & physiology*. Pearson education.

Marinesco, S., Bonnet, C., & Cespuglio, R. (1999). Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neuroscience*, *92*(3), 921-933.

Martire, V. L., Caruso, D., Palagini, L., Zoccoli, G., & Bastianini, S. (2020). Stress & sleep: A relationship lasting a lifetime. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *117*, 65-77.

Matsuda, Y., Ozawa, N., Shinozaki, T., Aoki, K., Nihonmatsu-Kikuchi, N., Shinba, T., & Tatebayashi, Y. (2020). Chronic antidepressant treatments rescue reduced REM sleep theta power in a rat social defeat stress model of depression. *bioRxiv*, 2020-03.

Matsuo, S. I., Jang, I. S., Nabekura, J., & Akaike, N. (2003). α2-Adrenoceptor-mediated presynaptic modulation of GABAergic transmission in mechanically dissociated rat ventrolateral preoptic neurons. *Journal of neurophysiology*, *89*(3), 1640-1648.

Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S., & Tononi, G. (2004). The sleep slow oscillation as a traveling wave. *Journal of Neuroscience*, *24*(31), 6862-6870.

Matsuda, Y., Ozawa, N., Shinozaki, T., Aoki, K., Nihonmatsu-Kikuchi, N., Shinba, T., & Tatebayashi, Y. (2021). Chronic antidepressant treatment rescues abnormally reduced REM sleep theta power in socially defeated rats. *Scientific reports*, *11*(1), 16713.

McCarley, R. W., & Hobson, J. A. (1975). Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science*, *189*(4196), 58-60.

McCARLEY, R. W., & Massaquoi, S. G. (1986). A limit cycle mathematical model of the REM sleep oscillator system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *251*(6), R1011-R1029.

McCormick, D. A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Progress in neurobiology*, *39*(4), 337-388.

McCormick, D. A., & Bal, T. (1997). Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual review of neuroscience*, *20*(1), 185-215.

McCoy, J. G., & Strecker, R. E. (2011). The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiology of learning and memory*, *96*(4), 564-582.

McGinty, D., Gong, H., Suntsova, N., Alam, M. N., Methippara, M., Guzman-Marin, R., & Szymusiak, R. (2004). Sleep-promoting functions of the hypothalamic median preoptic nucleus: inhibition of arousal systems. *Archives Italiennes de Biologie*, *142*(4), 501-509.

McKlveen, J. M., Myers, B., & Herman, J. P. (2015). The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *Journal of neuroendocrinology*, *27*(6), 446-456.

Meerlo, P., Pragt, B. J., & Daan, S. (1997). Social stress induces high intensity sleep in rats. *Neuroscience letters*, *225*(1), 41-44.

Meerlo, P., & Turek, F. W. (2001). Effects of social stimuli on sleep in mice: non-rapid-eye-movement (NREM) sleep is promoted by aggressive interaction but not by sexual interaction. *Brain research*, *907*(1-2), 84-92.

Mellman, T. A., Bustamante, V., Fins, A. I., Pigeon, W. R., & Nolan, B. (2002). REM sleep and the early development of posttraumatic stress disorder. *American Journal of Psychiatry*, *159*(10), 1696-1701.

Mellman, T. A., & Hipolito, M. M. S. (2006). Sleep disturbances in the aftermath of trauma and posttraumatic stress disorder. *CNS spectrums*, *11*(8), 611-615.

Mellman, T. A., Pigeon, W. R., Nowell, P. D., & Nolan, B. (2007). Relationships between REM sleep findings and PTSD symptoms during the early aftermath of trauma. *Journal of traumatic stress*, *20*(5), 893-901.

Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., & Siegel, J. M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, *46*(5), 787-798.

Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N., & Wada, H. (1992). Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiology & behavior*, *51*(2), 391-394.

Mochizuki, T., Arrigoni, E., Marcus, J. N., Clark, E. L., Yamamoto, M., Honer, M., ... & Scammell, T. E. (2011). Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(11), 4471-4476.

Moffitt, J. R., Bambah-Mukku, D., Eichhorn, S. W., Vaughn, E., Shekhar, K., Perez, J. D., ... & Zhuang, X. (2018). Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region. *Science*, *362*(6416), eaau5324.

Morairty, S. R., Dittrich, L., Pasumarthi, R. K., Valladao, D., Heiss, J. E., Gerashchenko, D., & Kilduff, T. S. (2013). A role for cortical nNOS/NK1 neurons in coupling homeostatic sleep drive to EEG slow wave activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(50), 20272-20277.

Murray, N. M., Buchanan, G. F., & Richerson, G. B. (2015). Insomnia caused by serotonin depletion is due to hypothermia. *Sleep*, *38*(12), 1985-1993.

Myers, B., Scheimann, J. R., Franco-Villanueva, A., & Herman, J. P. (2017). Ascending mechanisms of stress integration: Implications for brainstem regulation of neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *74*, 366-375.

Nelson, R. J., & Trainor, B. C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(7), 536-546.

Numa, C., Nagai, H., Taniguchi, M., Nagai, M., Shinohara, R., & Furuyashiki, T. (2019). Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex. *Scientific reports*, *9*(1), 16670.

Ogawa, Y., & Kawamura, H. (1988). Increase of multiple unit activity during slow wave sleep in the cat preoptic area. *Brain research bulletin*, *20*(6), 897-902.

Ostrander, M. M., Badiani, A., Day, H. E. W., Norton, C. S., Watson, S. J., Akil, H., & Robinson, T. E. (2003). Environmental context and drug history modulate amphetamine-induced c-fos mRNA expression in the basal ganglia, central extended amygdala, and associated limbic forebrain. *Neuroscience*, *120*(2), 551-571.

Page, G. G., Opp, M. R., & Kozachik, S. L. (2016). Sex differences in sleep, anhedonia, and HPA axis activity in a rat model of chronic social defeat. *Neurobiology of Stress*, *3*, 105-113.

Palma, B. D., Suchecki, D., & Tufik, S. (2000). Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain research*, *861*(1), 97-104.

Panula, P., Yang, H. Y., & Costa, E. (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(8), 2572-2576.

Park, S. H., & Weber, F. (2020). Neural and homeostatic regulation of REM sleep. *Frontiers in psychology*, *11*, 1662.

Pawlyk, A. C., Morrison, A. R., Ross, R. J., & Brennan, F. X. (2008). Stress-induced changes in sleep in rodents: models and mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(1), 99-117.

Peigneux, P., Laureys, S., Delbeuck, X., & Maquet, P. (2001). Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. *Neuroreport*, *12*(18), A111-A124.

Pieribone, V. A., Xu, Z. Q., Zhang, X., Grillner, S., Bartfai, T., & Hökfelt, T. (1995). Galanin induces a hyperpolarization of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in the brainstem slice. *Neuroscience*, *64*(4), 861-874.

Puizillout, J. J., Gaudin-Chazal, G., Daszuta, A., Seyfritz, N., & Ternaux, J. P. (1979). Release of endogenous serotonin from" encephale isole" cats. II-Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *Journal de physiologie*, *75*(5), 531-537.

Pollock, M. S., & Mistlberger, R. E. (2003). Rapid eye movement sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain research*, *962*(1-2), 68-77.

Portas, C. M., & McCarley, R. W. (1994). Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus: a microdialysis study in the freely moving cat. *Brain research*, *648*(2), 306-312.

Preuss, T. M. (1995). Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *Journal of cognitive neuroscience*, *7*(1), 1-24.

Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 56-72.

Radley, J. J., Arias, C. M., & Sawchenko, P. E. (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *Journal of Neuroscience*, *26*(50), 12967-12976.

Radley, J. J., Williams, B., & Sawchenko, P. E. (2008). Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. *Journal of Neuroscience*, *28*(22), 5806-5816.

Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N., & Jouvet, M. (1991). Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neuroscience letters*, *126*(2), 113-118.

Rampon, C., Luppi, P. H., Fort, P., Peyron, C., & Jouvet, M. (1996). Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience*, *75*(3), 737-755.

Ranson, S. W. (1939). Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Archives of Neurology & Psychiatry*, *41*(1), 1-23.

Rasch, B., Büchel, C., Gais, S., & Born, J. (2007). Odor cues during slow-wave sleep prompt declarative memory consolidation. *Science*, *315*(5817), 1426-1429.

Rasch, B., & Born, J. (2013). About sleep's role in memory. *Physiological reviews*.

Reitz, S. L., Wasilczuk, A. Z., Beh, G. H., Proekt, A., & Kelz, M. B. (2021). Activation of preoptic tachykinin 1 neurons promotes wakefulness over sleep and volatile anesthetic-induced unconsciousness. *Current Biology*, *31*(2), 394-405.

Riemann, D., Spiegelhalder, K., Nissen, C., Hirscher, V., Baglioni, C., & Feige, B. (2012). REM sleep instability–a new pathway for insomnia?. *Pharmacopsychiatry*, *45*(05), 167-176.

Romanowski, C. P., Fenzl, T., Flachskamm, C., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J. M., & Kimura, M. (2010). Central deficiency of corticotropin-releasing hormone receptor type 1

(CRH-R1) abolishes effects of CRH on NREM but not on REM sleep in mice. *Sleep*, *33*(4), 427-436.

Rose, J. E., & Woolsey, C. N. (1949). Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, *1*(1-4), 391-404.

Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rüther, E., & Havemann-Reinecke, U. (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behavioural brain research*, *162*(1), 127-134.

Saint-Mleux, B., Eggermann, E., Bisetti, A., Bayer, L., Machard, D., Jones, B. E., ... & Serafin, M. (2004). Nicotinic enhancement of the noradrenergic inhibition of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area. *Journal of Neuroscience*, *24*(1), 63-67.

Sakai, K. (2017). Are there sleep-promoting neurons in the mouse parafacial zone?. *Neuroscience*, *367*, 98-109.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., ... & Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, *92*(4), 573-585.

Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N., & 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), 669-683.

Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep state switching. *Neuron*, *68*(6), 1023-1042.

Saper, C. B., & Fuller, P. M. (2017). Wake–sleep circuitry: an overview. *Current opinion in neurobiology*, *44*, 186-192.

Sakai, K., & Koyama, Y. (1996). Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons?. *Neuroreport*, *7*(15), 2449-2454.

Sakai, K., Crochet, S., & Onoe, H. (2001). Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Archives italiennes de biologie*, *139*(1), 93-107.

Sara, S. J., & Herve-Minvielle, A. (1995). Inhibitory influence of frontal cortex on locus coeruleus neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(13), 6032-6036.

Sasaki, K., Suzuki, M., Mieda, M., Tsujino, N., Roth, B., & Sakurai, T. (2011). Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PloS one*, *6*(5), e20360.

Sastre, J. P., Buda, C., Kitahama, K., & 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), 415-426.

Sanford, L. D., Yang, L., & Tang, X. (2003). Influence of contextual fear on sleep in mice: a strain comparison. *Sleep*, *26*(5), 527-540.

Sanford, L. D., Tang, X., Xiao, J., Ross, R. J., & Morrison, A. R. (2003). GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *Journal of neurophysiology*, *90*(2), 938-945.

Sanford, L. D., Yang, L., Wellman, L. L., Liu, X., & Tang, X. (2010). Differential effects of controllable and uncontrollable footshock stress on sleep in mice. *Sleep*, *33*(5), 621-630.

Sanford, L. D., Suchecki, D., & Meerlo, P. (2015). Stress, arousal, and sleep. *Sleep, neuronal plasticity and brain function*, 379-410.

Sapin, E., Lapray, D., Bérod, A., Goutagny, R., Léger, L., Ravassard, P., ... & Luppi, P. H. (2009). Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PloS one*, *4*(1), e4272.

Sassin, J. F., Parker, D. C., Mace, J. W., Gotlin, R. W., Johnson, L. C., & Rossman, L. G. (1969). Human growth hormone release: relation to slow-wave sleep and sleep-waking cycles. *Science*, *165*(3892), 513-515.

Scammell, T. E., Arrigoni, E., & Lipton, J. O. (2017). Neural circuitry of wakefulness and sleep. *Neuron*, *93*(4), 747-765

Schöne, C., Apergis-Schoute, J., Sakurai, T., Adamantidis, A., & Burdakov, D. (2014). Coreleased orexin and glutamate evoke nonredundant spike outputs and computations in histamine neurons. *Cell reports*, *7*(3), 697-704.

Schönrock, B., Büsselberg, D., & Haas, H. L. (1991). Properties of tuberomammillary histamine neurones and their response to galanin. *Agents and actions*, *33*, 135-137.

Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, *138*(3479), 32-32.

Selye, H. (1950). The physiology and Pathology of ex posure to stress. A treatise based on the concepts of the general-adaptation-syndrome and the diseases of adaptation.

Selye, H. (1974). Stress without distress. In *Psychopathology of human adaptation* (pp. 137-146). Boston, MA: Springer US.

Sewards, T. V., & Sewards, M. A. (2002). The medial pain system: neural representations of the motivational aspect of pain. *Brain research bulletin*, *59*(3), 163-180.

Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W., & Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, *271*(5246), 216-219.

Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F., & Saper, C. B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *Journal of Neuroscience*, *18*(12), 4705-4721.

Shi, Y. F., Han, Y., Su, Y. T., Yang, J. H., & Yu, Y. Q. (2015). Silencing of cholinergic basal forebrain neurons using archaerhodopsin prolongs slow-wave sleep in mice. *PLoS One*, *10*(7), e0130130.

Shiromani, P. J., Winston, S., & McCarley, R. W. (1996). Pontine cholinergic neurons show Fos-like immunoreactivity associated with cholinergically induced REM sleep. *Molecular brain research*, *38*(1), 77-84.

Shors, T. J., Seib, T. B., Levine, S., & Thompson, R. F. (1989). Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science*, *244*(4901), 224-226.

Shouse, M. N., & Siegel, J. M. (1992). Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain research*, *571*(1), 50-63.

Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*, *8*(4), 383-395.

Smith, A., Hyland, L., Al-Ansari, H., Watts, B., Silver, Z., Wang, L., ... & Abizaid, A. (2023). Metabolic, neuroendocrine and behavioral effects of social defeat in male and female mice

using the chronic non-discriminatory social defeat stress model. *Hormones and Behavior*, *155*, 105412.

Spiegel, K., Follenius, M., Simon, C., Saini, J., Ehrhart, J., & Brandenberger, G. (1994). Prolactin secretion and sleep. *Sleep*, *17*(1), 20-27.

Stephens, M. A. C., & Wand, G. (2012). Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research: current reviews*, *34*(4), 468.

Steininger, T. L., Alam, M. N., Gong, H., Szymusiak, R., & McGinty, D. (1999). Sleep–waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain research*, *840*(1-2), 138-147.

Steininger, T. L., Gong, H., Mcginty, D., & Szymusiak, R. (2001). Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal–related monoaminergic cell groups. *Journal of Comparative Neurology*, *429*(4), 638-653.

Steriade, M., Dossi, R. C., & 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. *Journal of Neuroscience*, *11*(10), 3200-3217.

Steriade, M. (2006). Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience*, *137*(4), 1087-1106.

Stickgold, R. (2005). Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*, *437*(7063), 1272-1278.

Su, Y. J., Yi, P. L., & Chang, F. C. (2024). Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Ameliorates Stress-Induced Sleep Disruption via Activating Infralimbic-Ventrolateral Preoptic Projections. *Brain Sciences*, *14*(1), 105.

Suchecki, D., Tiba, P. A., & Machado, R. B. (2012). REM sleep rebound as an adaptive response to stressful situations. *Frontiers in neurology*, *3*, 41.

Suntsova, N., Guzman-Marin, R., Kumar, S., Alam, M. N., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2007). The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, *27*(7), 1616-1630.

Szymusiak, R., & McGinty, D. (1986). Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain research*, *370*(1), 82-92.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L., & McGinty, D. (1998). Sleep–waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain research*, *803*(1-2), 178-188.

Takahashi, K., Lin, J. S., & Sakai, K. (2006). Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake–sleep states in the mouse. *Journal of Neuroscience*, *26*(40), 10292-10298.

Takahashi, K., Lin, J. S., & Sakai, K. (2009). Characterization and mapping of sleep–waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience*, *161*(1), 269-292.

Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J. S., & Sakai, A. K. (2010). Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, *169*(3), 1115-1126.

Tank, A. W., & Wong, D. L. (2015). Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. Comprehensive Physiology, 5, 1-15.

Tasali, E., Leproult, R., Ehrmann, D. A., & Van Cauter, E. (2008). Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(3), 1044-1049.

Taylor, S. E., & Stanton, A. L. (2007). Coping resources, coping processes, and mental health. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, *3*(1), 377-401.

Tononi, G., & Cirelli, C. (2014). Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*, *81*(1), 12-34.

Tseng, Y. T., Zhao, B., Chen, S., Ye, J., Liu, J., Liang, L., ... & Wang, L. (2022). The subthalamic corticotropin-releasing hormone neurons mediate adaptive REM-sleep responses to threat. *Neuron*, *110*(7), 1223-1239.

Tsunematsu, T., Ueno, T., Tabuchi, S., Inutsuka, A., Tanaka, K. F., Hasuwa, H., ... & Yamanaka, A. (2014). Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *Journal of Neuroscience*, *34*(20), 6896-6909.

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews neuroscience*, *10*(6), 397-409.

Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Sleep–active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *European journal of neuroscience*, *23*(12), 3284-3296.

Valentino, R. J., Foote, S. L., & Aston-Jones, G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain research*, *270*(2), 363-367.

Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European journal of pharmacology*, *583*(2-3), 194-203.

Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., Venance, L., ... & Buzsáki, G. (2014). Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(37), 13535-13540.

Van De Werd, H. J. J. M., Rajkowska, G., Evers, P., & Uylings, H. B. (2010). Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain Structure and Function*, *214*, 339-353.

Van Dort, C. J., Zachs, D. P., Kenny, J. D., Zheng, S., Goldblum, R. R., Gelwan, N. A., ... & Brown, E. N. (2015). Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(2), 584-589.

Vanini, G., Bassana, M., Mast, M., Mondino, A., Cerda, I., Phyle, M., ... & Mashour, G. A. (2020). Activation of preoptic GABAergic or glutamatergic neurons modulates sleep-wake architecture, but not anesthetic state transitions. *Current Biology*, *30*(5), 779-787.

Vanni-Mercier, G., Gigout, S., Debilly, G., & 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. *Behavioural brain research*, *144*(1-2), 227-241.

Varin, C. (2016). Contribution de noyaux hypothalamiques et de leur interconnexion à la régulation du sommeil (Doctoral dissertation, Université de Lyon).

Vazquez-Palacios, G., & Velazquez-Moctezuma, J. (2000). Effect of electric foot shocks, immobilization, and corticosterone administration on the sleep–wake pattern in the rat. *Physiology & behavior*, *71*(1-2), 23-28.

Venner, A., Anaclet, C., Broadhurst, R. Y., Saper, C. B., & Fuller, P. M. (2016). A novel population of wake-promoting GABAergic neurons in the ventral lateral hypothalamus. *Current Biology*, *26*(16), 2137-2143.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Léger, L., ... & Luppi, P. H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC neuroscience*, *4*, 1-10.

Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, *51*(1), 32-58.

Vertes, R. P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*, *142*(1), 1-20.

Vetrivelan, R., Fuller, P. M., Tong, Q., & Lu, J. (2009). Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *Journal of neuroscience*, *29*(29), 9361-9369.

Vetrivelan, R., Kong, D., Ferrari, L. L., Arrigoni, E., Madara, J. C., Bandaru, S. S., ... & Saper, C. B. (2016). Melanin-concentrating hormone neurons specifically promote rapid eye movement sleep in mice. *Neuroscience*, *336*, 102-113.

Vivaldi, E. A., Ocampo, A. D. R. I. A. N., Wyneken, U. R. S. U. L. A., Roncagliolo, M., & Zapata, A. M. (1994). Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat. *Journal of neurophysiology*, *72*(4), 1745-1755.

Von Frijtag, J. C., Reijmers, L. G. J. E., Van der Harst, J. E., Leus, I. E., Van den Bos, R., & Spruijt, B. M. (2000). Defeat followed by individual housing results in long-term impaired reward-and cognition-related behaviours in rats. *Behavioural brain research*, *117*(1-2), 137-146.

Wang, H. L., & Morales, M. (2009). Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *29*(2), 340-358.

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., ... & Wada, H. (1984). Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats;

a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decar□ ylase as a marker. *Brain research*, *295*(1), 13-25.

Weber, F., Chung, S., Beier, K. T., Xu, M., Luo, L., & Dan, Y. (2015). Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons. *Nature*, *526*(7573), 435-438.

Weber, F., & Dan, Y. (2016). Circuit-based interrogation of sleep control. *Nature*, *538*(7623), 51-59.

Weber, F. (2017). Modeling the mammalian sleep cycle. *Current opinion in neurobiology*, *46*, 68-75.

Weber, F., Hoang Do, J. P., Chung, S., Beier, K. T., Bikov, M., Saffari Doost, M., & Dan, Y. (2018). Regulation of REM and non-REM sleep by periaqueductal GABAergic neurons. *Nature communications*, *9*(1), 354.

Webster, H. H., & Jones, B. E. (1988). Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain research*, *458*(2), 285-302.

Wells, A. M., Ridener, E., Bourbonais, C. A., Kim, W., Pantazopoulos, H., Carroll, F. I., ... & Carlezon, W. A. (2017). Effects of chronic social defeat stress on sleep and circadian rhythms are mitigated by kappa-opioid receptor antagonism. *Journal of neuroscience*, *37*(32), 7656-7668.

Wisor, J. P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G. H., Mignot, E., & Edgar, D. M. (2001). Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *Journal of Neuroscience*, *21*(5), 1787-1794.

Wouterlood, F. G., Steinbusch, H. W. M., Luiten, P. G. M., & Bol, J. G. J. M. (1987). Projection from the prefrontal cortex to histaminergic cell groups in the posterior hypothalamic region of the rat. Anterograde tracing withPhaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decar□ ylase. *Brain research*, *406*(1-2), 330-336.

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., ... & Nedergaard, M. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *science*, *342*(6156), 373-377.

Xu, M., Chung, S., Zhang, S., Zhong, P., Ma, C., Chang, W. C., ... & Dan, Y. (2015). Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nature neuroscience*, *18*(11), 1641-1647.

Yamuy, J., Mancillas, J. R., Morales, F. R., & Chase, M. H. (1993). C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. *Journal of Neuroscience*, *13*(6), 2703-2718.

Yang, L., Tang, X., Wellman, L. L., Liu, X., & Sanford, L. D. (2009). Corticotropin releasing factor (CRF) modulates fear-induced alterations in sleep in mice. *Brain research*, *1276*, 112-122.

Yang, L., Wellman, L. L., Ambrozewicz, M. A., & Sanford, L. D. (2011). Effects of stressor predictability and controllability on sleep, temperature, and fear behavior in mice. *Sleep*, *34*(6), 759-771.

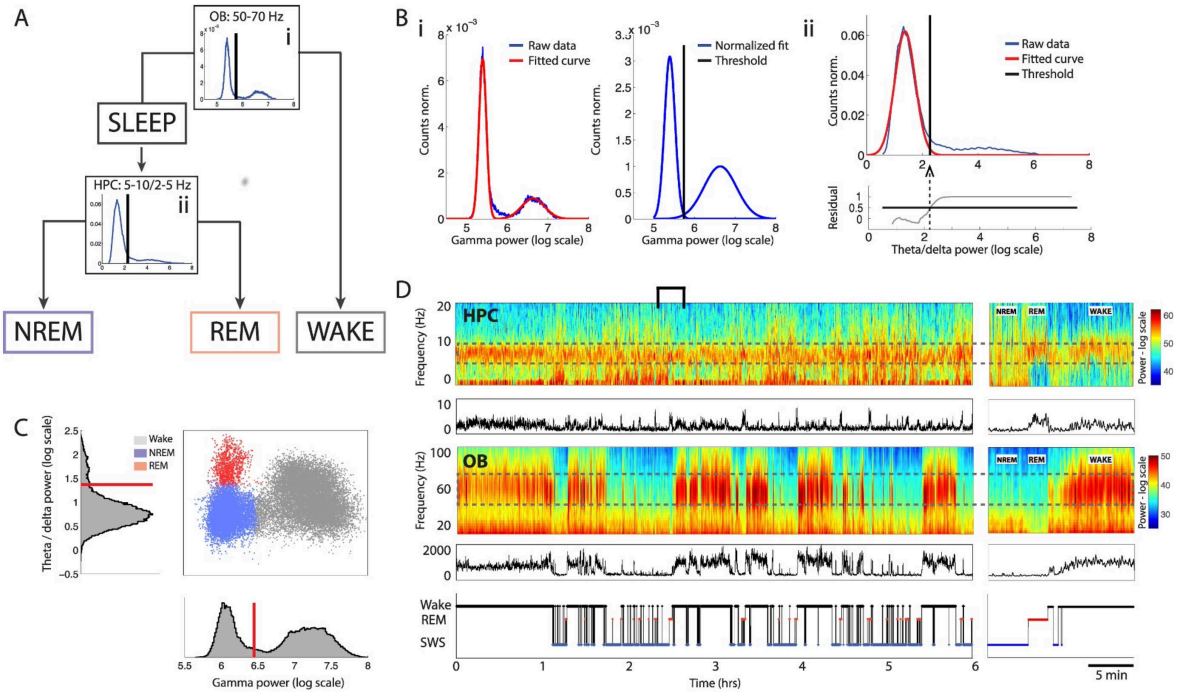
Yoshida, K., McCormack, S., España, R. A., Crocker, A., & Scammell, T. E. (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, *494*(5), 845-861.

Yu, X., Zhao, G., Wang, D., Wang, S., Li, R., Li, A., ... & Wisden, W. (2022). A specific circuit in the midbrain detects stress and induces restorative sleep. *Science*, *377*(6601), 63-72.

Zhang, Z., Ferretti, V., Güntan, İ., Moro, A., Steinberg, E. A., Ye, Z., ... & Franks, N. P. (2015). Neuronal ensembles sufficient for recovery sleep and the sedative actions of α2 adrenergic agonists. *Nature neuroscience*, *18*(4), 553-561.

Zozulya, A. A., Gabaeva, M. V., Sokolov, O. Y., Surkina, I. D., & Kost, N. V. (2008). Personality, coping style, and constitutional neuroimmunology. *Journal of immunotoxicology*, *5*(2), 221-225.

Annexes



Annexe 1. Schéma de la méthode de classification du sommeil et application à un exemple d'ensemble de données. A. Organigramme des données via l'algorithme de classification. Les états de sommeil et d'éveil sont d'abord classés en fonction du gamma du OB (i). Les données de sommeil sont ensuite classées en sommeil paradoxal et sommeil lent en fonction du rapport de puissance HPC thêta/delta (ii). **B.** Exemple de seuillage automatique des distributions. (i) Deux distributions gaussiennes sont ajustées à la distribution de la puissance gamma OB (à gauche), et leurs aires sont égalisées (à droite). Le seuil est placé à l'intersection des deux distributions. (ii) Une distribution gaussienne est ajustée à la distribution du rapport de puissance HPC thêta/delta pendant le sommeil. Les résidus sont indiqués dans le graphique du bas. Le seuil est placé au point où l'ajustement explique moins de 50 % des données. **C.** Espace de phase des états cérébraux montrant la distribution des données de sommeil lent (bleu), sommeil paradoxal (rouge) et d'éveil (gris) pour un exemple de souris. Les histogrammes correspondants sont affichés le long de l'axe correspondant, avec les seuils déterminés automatiquement en rouge. **D.** Spectrogramme basse fréquence de l'HPC avec rapport de puissance thêta/delta en-dessous, spectrogramme haute fréquence de l'OB avec puissance gamma en-dessous et hypnogramme pour la même souris que dans C. Les bandes de fréquences pertinentes sont délimitées par une ligne grise en pointillés. À droite : zone entre parenthèses sur une échelle de temps étendue. *Adapté de Bagur et al., 2018.*

RÉSUMÉ

Bien que beaucoup d'attention ait été consacrée à la dissection des circuits neuronaux qui sous-tendent l'architecture du sommeil de base, les mécanismes par lesquels les centres du sommeil s'adaptent de manière dynamique aux défis environnementaux demeurent mal connus. L'objectif de cette thèse était de déterminer comment et par quels mécanismes le sommeil est influencé par le stress chez la souris.

La première partie de ma thèse a mis en évidence que le stress de défaite sociale (SDS) induit un état initial et transitoire d'insomnie, suivi d'un retour à des quantités de sommeil normales. Malgré cette récupération apparente, les souris ont montré une fragmentation du sommeil paradoxal qui a persisté plusieurs heures après le SDS. Grâce à l'inhibition chémogénétique, nous avons démontré que les projections du cortex préfrontal (PFC) vers le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO) sont recrutées sélectivement dans des situations stressantes et sont nécessaires à la fragmentation du sommeil paradoxal induite par le SDS. De plus, nous avons montré que l'activation de la voie PFC-VLPO est suffisante pour imiter la fragmentation du sommeil paradoxal en l'absence d'un stress. Grâce à une approche optogénétique ex vivo, nous avons précisé le mécanisme cellulaire sous-jacent à cette voie en montrant que le PFC module directement les neurones promoteurs de sommeil du VLPO. En outre, l'activation in vivo de la voie PFC-VLPO interrompt le sommeil paradoxal au profit du sommeil lent, ce qui est en accord avec le rôle bien établi du VLPO. L'ensemble de ces résultats suggère un mécanisme limitant le temps passé en sommeil paradoxal, un état de forte vulnérabilité, qui permettrait à l'individu d'être plus réactif et prêt à affronter un danger ; sans toutefois supprimer la quantité totale de sommeil, indispensable à la survie. Dans la deuxième partie de mon travail, nous avons montré que les neurones du VLPO exprimant le CRH ($VLPO^{CRH}$) étaient une cible privilégiée des projections excitatrices du PFC. Nos résultats mettent en évidence que l'activation chémogénétique des neurones $VLPO^{CRH}$ diminue fortement le sommeil paradoxal au profit d'un sommeil lent plus consolidé. Cependant, leur inhibition chémogénétique n'a eu aucun effet sur l'architecture du sommeil, suggérant que ces neurones ne seraient pas actifs de manière tonique en condition normale/ non stressante.

La troisième et dernière partie de mon travail a consisté à développer une nouvelle méthode de classification précise et automatique du sommeil paradoxal. En effet, les parties précédentes de ma thèse ont mis en évidence que le stress peut entraîner des périodes de sommeil paradoxal particulièrement brèves qui peuvent être négligées par les méthodes de classification classiques. J'ai donc mis au point une approche permettant de capturer les fines modifications du sommeil et de quantifier les paramètres qui peuvent être subjectifs avec une classification manuelle. Ces résultats s'inscrivent donc dans une démarche de reproductibilité maximale.

MOTS CLÉS

Sommeil paradoxal, stress, noyau préoptique ventrolatéral, cortex préfrontal

ABSTRACT

Although much attention has been dedicated to dissect the complex circuits underlying basic sleep architecture, how sleep centers dynamically adapt to environmental challenges remains to be fully understood. The objective of this thesis was to determine, in mice, how and by which mechanisms sleep is influenced by stress.

The first part of my thesis demonstrates that the social defeat stress (SDS) induces an initial state of insomnia before sleep quantities return to normal. Beside this apparent recovery, mice showed a REM sleep fragmentation that persisted many hours after SDS. Using chemogenetic inhibition, we demonstrated that prefrontal cortex (PFC) projections to the VLPO are selectively recruited under stressful situations and necessary for the SDS-induced REM sleep fragmentation. We further demonstrate that the optogenetic activation of the PFC- VLPO pathway is sufficient to mimic the REM sleep fragmentation in the absence of an actual stressor. Finally, using ex vivo optogenetics, we precise the cellular mechanism underlying this pathway by showing that the PFC directly modulates VLPO sleep-promoting neurons. Consistent with that, we show that in vivo activation of the PFC-VLPO pathway interrupts REM sleep in favor of NREM sleep, which is in line with the well established role of the VLPO. Altogether these results provide a mechanism to shorten the time spent in REM sleep, a state of great vulnerability, allowing the individual to be more responsive and ready to face a danger, without suppressing the total amount of sleep, essential for survival.

In the second part of my work, we showed that the CRH-expressing neurons ($VLPO^{CRH}$) were a predilection target from the PFC excitatory projections. We then investigated the role of the $VLPO^{CRH}$ neurons in basal sleep regulation. Our results highlight that activation of the $VLPO^{CRH}$ neurons strongly suppress REM sleep, favoring a more consolidated NREM sleep. However, chemogenetic inhibition of the $VLPO^{CRH}$ neurons had no effect on the sleep architecture.

The third, and last part, of my work sought to establish a novel method to accurately and automatically classify REM sleep. Indeed, previous parts of my thesis highlighted that stress can cause REM sleep bouts to be particularly short. These brief periods can be overlooked by classical scoring methods. We developed an approach capable of capturing these fine sleep modifications and tracking parameters that can be usually subjective with manual scoring, thus ensuring maximal reproducibility.

KEYWORDS

REM sleep, stress, ventrolateral preoptic nucleus, prefrontal cortex