

Université de Montréal

**Contribution différentielle de Neuroligine-1 et d'EphA4
à la régulation du sommeil**

Par Marlène Freyburger

Département de neurosciences

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en neurosciences

Août, 2015

© Marlène Freyburger, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Contribution différentielle de Neuroligine-1 et d'EphA4
à la régulation du sommeil**

Présentée par :

Marlène Freyburger

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Louis-Éric Trudeau, président-rapporteur

Valérie Mongrain, directrice de recherche

Florin Amzica, membre du jury

Charles Bourque, examinateur externe

Anne-Noël Samaha, représentante du doyen de la FESP

Résumé

Le sommeil est un besoin vital et le bon fonctionnement de l'organisme dépend de la quantité et de la qualité du sommeil. Le sommeil est régulé par deux processus : un processus circadien qui dépend de l'activité des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus et qui régule le moment durant lequel nous allons dormir, et un processus homéostatique qui dépend de l'activité neuronale et se reflète dans l'intensité du sommeil. En effet, le sommeil dépend de l'éveil qui le précède et plus l'éveil dure longtemps, plus le sommeil est profond tel que mesuré par des marqueurs électroencéphalographiques (EEG). Des études ont montré que le bon fonctionnement de ces deux processus régulateurs du sommeil dépend de la plasticité synaptique. Ainsi, les éléments synaptiques régulant la communication et la force synaptique sont d'importants candidats pour agir sur la physiologie de la régulation du sommeil. Les molécules d'adhésion cellulaire sont des acteurs clés dans les mécanismes de plasticité synaptique. Elles régulent l'activité et la maturation des synapses. Des études ont montré que leur absence engendre des conséquences similaires au manque de sommeil. Le but de ce projet de thèse est d'explorer l'effet de l'absence de deux familles de molécule d'adhésion cellulaire, les neuroligines et la famille des récepteur Eph et leur ligand les éphrines dans les processus régulateurs du sommeil. Notre hypothèse est que l'absence d'un des membres de ces deux familles de molécule affecte les mécanismes impliqués dans le processus homéostatique de régulation du sommeil. Afin de répondre à notre hypothèse, nous avons étudié d'une part l'activité EEG chez des souris mutantes n'exprimant pas Neuroligine-1 (*Nlgn1*) ou le récepteur EphA4 en condition normale et après une privation de sommeil. D'autre part, nous avons mesuré les changements moléculaires ayant lieu dans ces deux modèles après privation de sommeil. Au niveau de l'activité EEG, nos résultats montrent que l'absence de *Nlgn1* augmente la densité des ondes lentes en condition normale et augmente l'amplitude et la pente des ondes lentes après privation de sommeil. *Nlgn1* est nécessaire au fonctionnement normal de la synchronie corticale, notamment après une privation de sommeil, lui attribuant ainsi un rôle clé dans l'homéostasie du sommeil. Concernant le récepteur EphA4, son absence affecte la durée du sommeil paradoxal ainsi que l'activité sigma qui dépend du processus circadien. Nos

résultats suggèrent donc que ce récepteur est un élément important dans la régulation circadienne du sommeil. Les changements transcriptionnels en réponse à la privation de sommeil des souris n'exprimant pas *Nlgn1* et *EphA4* ne sont pas différents des souris sauvages. Toutefois, nous avons montré que la privation de sommeil affectait la distribution des marques épigénétiques sur le génome, tels que la méthylation et l'hydroxyméthylation, et que l'expression des molécules régulant ces changements est modifiée chez les souris mutantes pour le récepteur EphA4.

Nos observations mettent en évidence que les molécules d'adhésion cellulaire, *Nlgn1* et le récepteur EphA4, possèdent un rôle important dans les processus homéostatique et circadien du sommeil et contribuent de manière différente à la régulation du sommeil.

Mots clés: Molécule d'adhésion cellulaire, EphA4, Neuroligine-1, plasticité synaptique, régulation sommeil/éveil, EEG, synchronie corticale, épigénétique, souris.

Abstract

Sleep is a vital need and the proper functioning of the body depends on the amount and quality of sleep. Sleep is regulated by two processes: a circadian process that depends on the activity of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus and regulates the time of day during which we are going to sleep, and a homeostatic process that seems to depend on neuronal activity and that reflects sleep intensity. The homeostatic process controls a pressure for sleep as a function of the amount of time spent awake. Indeed, sleep quality depends on the duration of preceding wakefulness, the more one is awake, deeper the sleep afterwards as measured by electroencephalographic markers (EEG). Studies have shown that the proper functioning of these two sleep regulatory processes depends on synaptic plasticity. Thus, elements that regulate synaptic communication and synaptic strength are important candidates to act upon the physiology of sleep regulation. Cell adhesion molecules are key elements regulating synaptic plasticity. They control synapse activities and maturation. Studies have shown that their absence leads to consequences similar to sleep deprivation. The aim of this study is to explore the effect of the absence of two different cellular adhesion molecule, Neuroligin-1 and EphA4 receptor in sleep regulatory processes. Our hypothesis is that the absence of either of these molecules will affect sleep regulation and more specifically sleep homeostasis. To address our hypothesis, we first studied EEG activity in mice which do not express *Nlgn1* and *EphA4* in normal condition or after sleep deprivation. Secondly, we measured the molecular changes that occur in these two models after sleep deprivation. At the level of EEG activity, our results show that the absence of Nlgn1 increases the density of slow waves under baseline condition, and that the amplitude and slope of slow waves are increased after sleep deprivation. We concluded that Nlgn1 is required for normal functioning of cortical synchrony especially after sleep deprivation, thereby giving it a key role in sleep homeostasis. Regarding the EphA4 receptor, its absence affects the duration of paradoxal sleep and sigma activity which are known to depend on the circadian process. These results suggest that the EphA4 receptor is an important element in the circadian regulation of sleep. The transcriptional response after sleep deprivation in mice not expressing *Nlgn1* or *EphA4* is not different from that in wild-type mice. However, we found

that sleep deprivation affects the distribution of specific epigenetic markers like methylation and hydroxymethylation and the expression of molecules regulating these changes is altered in EphA4 null mice.

Our observations show that two cell adhesion molecules, Nlgn1 and EphA4 receptor, have an important role in the homeostatic and circadian sleep process and contribute differentially to sleep regulation.

Keywords: cell adhesion molecules, EphA4, Neuroligin-1, synaptic plasticity, regulation sleep/wakefulness, EEG, cortical synchrony, epigenetic, mice.

Table des matières

RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
DÉDICACE	XVII
REMERCIEMENTS	XVIII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. Le sommeil.....	3
1.1.1. Définition et organisation du sommeil	3
1.1.2. La neuroanatomie du sommeil	6
1.1.3. Rôles du sommeil.....	9
1.1.4. Régulation du sommeil par deux processus.....	11
1.1.5. Le processus circadien.....	13
1.1.5.1. Marqueurs EEG du processus circadien	16
1.1.5.2. Marqueurs moléculaires du processus circadien	17
1.1.6. Régulation du sommeil par le processus homéostatique.....	18
1.1.6.1. Implication de l'adénosine et des cytokines.....	20
1.1.6.2. Implication des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA.....	22
1.1.6.3. Implication des gènes de l'horloge.....	23
1.1.6.4. Marqueurs EEG de l'homéostasie du sommeil.....	24
1.1.6.5. Marqueurs moléculaires de l'homéostasie du sommeil.....	27
1.2. Les molécules d'adhésion cellulaire.....	29
1.2.1. La famille des neuroligines.....	30
1.2.1.1. Description de la famille des neuroligines	30
1.2.1.2. Structure et localisation de Nlgn1	30
1.2.1.3. Les variants de transcription de Nlgn1	32

1.2.1.4. Rôle de <i>Nlgn1</i> dans la synaptogénèse.....	33
1.2.1.5. Rôle de <i>Nlgn1</i> dans la transmission glutamatergique.....	34
1.2.1.6. Effet de l'absence de <i>Nlgn1</i> sur la régulation du sommeil.....	35
1.2.2. La famille des récepteurs Eph et de leurs ligands les éphrines.....	37
1.2.2.1. Leur structure.....	38
1.2.2.2. La signalisation intracellulaire.....	40
1.2.2.3. Voies de signalisation d'EphA4.....	41
1.2.2.4. Rôle d'EphA4 dans la plasticité structurale et fonctionnelle.....	42
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS.....	46
2.1. Objectif et hypothèse générale.....	46
2.2. Objectifs et hypothèses spécifiques.....	47
2.2.1. Évaluation du rôle de <i>Nlgn1</i> sur les paramètres des ondes lentes et la réponse moléculaire à la privation de sommeil.....	47
2.2.2. Étude du rôle du récepteur EphA4 dans la régulation du sommeil et de l'effet de la quantité d'éveil et du temps du jour sur l'expression d'EphA4 et de ses partenaires d'interaction.....	48
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	50
3.1. Premier article.....	50
3.1.1. Contribution des coauteurs.....	50
3.1.2. Article 1.....	52
3.2. Deuxième article.....	89
3.2.1. Contribution des coauteurs.....	89
3.2.2. Article 2.....	90
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	123
4.1. Résumé des résultats de recherche.....	123
4.1.1. Rôle de <i>Nlgn1</i> dans la régulation du sommeil	123
4.1.2. Implication du récepteur EphA4 dans le processus circadien.....	125
4.2. Caractéristiques des ondes lentes chez les souris <i>Nlgn1</i> ^{-/-}	126

4.3. Analyse du transcriptome des souris <i>Nlgn1</i> ^{-/-} et <i>EphA4</i> ^{-/-} par puce à ADN.....	131
4.4. Rôle des marqueurs épigénétiques dans la régulation de la transcription.....	133
4.4.1. La méthylation de l'ADN.....	134
4.4.2. L'hydroxyméthylation de l'ADN.....	136
4.5. Rôle du récepteur EphA4 dans la plasticité synaptique lors du sommeil.....	138
4.5.1. Effet de l'absence du récepteur EphA4 sur la régulation du sommeil.....	138
4.5.2. Implication d'une voie de signalisation d'EphA4.....	141
4.5.3. Implication du récepteur EphA4 dans les processus mnésiques.....	142
4.5.4. Contrôle de la transcription par le récepteur EphA4.....	143
4.6. Implication des neurones à VIP dans le rôle du récepteur EphA4 sur le processus circadien	145
4.7. La rétraction astrocytaire.....	146
4.8. Limites de nos études.....	148
4.8.1. Utilisation de souris KO.....	148
4.8.2. Résolution spatiale et cellulaire de l'analyse par microarray	149
4.8.3. Étude de la méthylation sur les promoteurs.....	150
4.9. Conclusions et perspectives	151
 BIBLIOGRAPHIE.....	 153

Listes des figures et tableau

Introduction

Figure 1 : Exemples de signaux EEG/EMG d'éveil, de sommeil à ondes lentes (SOL) et de sommeil paradoxal (SP) chez la souris.....	5
Figure 2 : Vue d'ensemble des voies de neurotransmission impliquées dans la régulation des états de vigilance.....	8
Figure 3 : Modèle de régulation du sommeil à deux processus.....	13
Figure 4 : Boucle transcriptionnelle de l'horloge circadienne chez les mammifères.....	15
Figure 5 : Représentation de l'hypothèse de l'homéostasie synaptique.....	20
Figure 6 : Tracée EEG et raster plots de l'activité neuronale pendant du SOL en début (Early) et en fin (Late) de période de repos chez un rat.....	26
Figure 7 : Schéma représentant la localisation de Nlgn1 et Nlgn2 respectivement au niveau de synapse excitatrice et inhibitrice.....	32
Figure 8 : Représentation schématique de la structure du récepteur Eph et du ligand éphrine.....	39

Résultats

Article 1

Figure 1	73
Figure 2	74
Figure 3	75
Figure 4	76
Figure S1	86
Figure S2	87
Figure S3.....	88

Article 2

Figure 1	115
Figure 2	116
Figure 3	117
Figure 4	118
Figure 5	119
Figure 6	120
Figure 7.....	121
Table 1	122

Liste des abréviations

5-HT : sérotonine

5hmC : hydroxyméthylation

5mC : méthylation

A1R : récepteur à adenosine 1

Abl : « Abl related gene »

Ach : acétycholine

AD : « Alzheimer's disease »

AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate

AOL : activité à ondes lentes

APC : « anaphase-promoting complex »

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

Avp : « Arginine vasopressin »

A β : amyloïde Beta

BF : prosencéphale basal

bp : « base pair »

C-terminal : carboxy-terminal

Ca²⁺ : calcium

CCG : « clock-controlled gene »

Cdk5 : « Cyclin-dependent kinase 5 »

Ctrl : « control »

DA : dopamine

DAG : diacyglycérole

DNMT : ADN méthyltransférase

ECoG : électrocorticogramme

EEG : électroencéphalogramme

EMG : électromyogramme

Eph : « erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell-derived »

EphA4 : récepteur EphA4

Éphrine : « eph receptor interacting proteins »

FDR : « false discovery rate »

FFT : « fast fourrier transform »

g : gramme

GABA : acide gamma-aminobutyrique

Gal : galanine

GDP : guanosine di-phosphate

GEFs : « Guanine nucleotide Exchange Factors »

GFAP : « Glial fibrillary acidic protein »

GRIP : « Glutamate Receptor Interacting Protein »

Grp : « Gastrin-releasing peptide »

GTP : guanosine tri-phosphate

h : heure

HET : hétérozygote

His : histamine

Hz : hertz

ICV : intracérébroventriculaire

IL-1 β : interleukine 1 Beta

IP₃ : inositol 1-4-5-triphosphate

IPA : « ingenuity pathway analysis »

KO : « knock-out »

LC : locus coeruleus

LDT : noyau tegmental dorso-latéral

LH : hypothalamus lateral

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

MAPK : « mitogen-activated protein kinase »

MCH : hormone à mélation-concentration
min : minute
mTOR : « mammalian Target of Rapamycin »
N-terminal : amino-terminal
NA : noradrénaline
NaCl : chlorure de sodium
NF κ B : facteur nucléaire kappa B
NLGN : neuroligine
Nlgn1, NLGN1 : neuroligine-1
Nlgn1A : neuroligine-1 possédant l'insert A
Nlgn1AB : neuroligine-1 possédant les inserts A et B
Nlgn1b : neuroligine-1 possédant l'insert B
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NREM : non rapid eye movement
NREMS : non rapid eye movement sleep
NRX : neurexine
NSS : « neurological severity score »
ORX : orexine
pb : paire de base
PDZ : « postsynaptic density disc large zona occludens »
Pef : perifornical
PI3 kinase : phosphatidylinositol-3 kinase
PICK : « protein that interacts with C kinase1 »
PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PLC γ : phospholipase-C gamma
Processus C : processus circadien de la régulation du sommeil
Processus S : processus homéostatique de la régulation du sommeil
PSD-95 : « postsynaptic density protein 95 »
PTT : noyau pédonculopontine

qPCR : PCR quantitative
REM : rapid eye movement
REMS : rapid eye movement sleep
S-SCAM : « synaptic scaffolding molecule »
SAM : « sterile alpha-motif »
SCN : noyau suprachiasmatique
SD : « sleep deprivation »
sec : seconde
SEM : « standard error of the mean »
SH2 : « src homology 2 »
SNC : système nerveux central
SNAP-25 : « Synaptoneurosomal-Associated Protein-25 »
SOL : sommeil à ondes lentes
SON : noyau supraoptique
SP : sommeil paradoxal
SRS : substances régulatrices du sommeil
SW : « slow waves »
TET : « ten-eleven translocation »
TMN : noyau tuberomammilaire
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha
VIP : peptide vasoactif intestinal
Vipr2 : récepteur au VIP 2
VLPO : noyau ventrolatéral de l'hypothalamus
WT : « wild-type »
ZT : « zeitgeber »
 μ V : microvolt

À mes parents,

Martine et Jean-Claude Freyburger

et en l'honneur de ma grand-mère,

Emma Freyburger

la femme la plus extraordinaire...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Dre. Valérie Mongrain, qui m'a accueillie dans son laboratoire suite à un mauvais départ en doctorat à Paris. Elle a fait un pari en m'acceptant en tant qu'étudiante au doctorat et je ne pourrais jamais la remercier assez pour m'avoir donné cette chance. Elle a su me faire confiance et a cru en mes compétences. Elle m'a écoutée lorsque j'avais de nouvelles idées me permettant de développer mon sens de l'initiative et m'a donné l'opportunité de me dépasser tout en me soutenant. Elle a su être très humaine comprenant mes doutes, mes craintes et a toujours su me rassurer. Merci pour ta patience, ton enthousiasme, ton soutien incommensurable, ta disponibilité, ta générosité,... et la liste pourrait être encore longue ! J'ai beaucoup appris à tes côtés, scientifiquement et humainement. Grâce à toi, j'ai acquis un peu plus de confiance en moi !

Comment j'aurais pu faire une si belle thèse sans le soutien de notre belle assistante de recherche Erika Bélanger-Nelson ! Erika, mon rayon de soleil du matin, qui a su m'écouter, m'aider, et qui m'a tellement appris ! Je ne serai pas la scientifique que je suis devenue sans toi, tu as été si patiente, compréhensive et pleine de sagesse ! Je garderai toujours en mémoire nos manips « disco » quand nous faisons les expériences d'imagerie... Un immense merci Erika, c'était un vrai bonheur de travailler à tes côtés.

Je souhaite remercier tous les étudiants de maîtrise ou stagiaires d'été qui ont été là et m'ont aidée dans mon projet. Mention spéciale à Janine El Helou qui a su me faire rire quand ça n'allait pas, qui m'a toujours encouragée dans mes expériences et qui m'a fait découvrir les fameux clubs sandwiches de la cafétéria. Merci à Gabrielle Paquette, Jennifer Bernier, Laura Semenzato, Audrey Pierre sans qui les analyses de scoring n'auraient pas avancées aussi vite et merci à Lydia Hannou qui a toujours été disponible pour m'aider.

Je voudrais remercier tous les membres du centre de recherche, Mélanie Welman qui a toujours été de bon conseil et qui a su avoir une oreille attentive et compréhensive dans les moments difficiles, et qui m'encourageait avec ses « Lâche pas », merci pour ton soutien ! Merci à Chloé

Provost qui s'est occupée de mes animaux avec beaucoup d'attention. Merci à Gaétan Tremblay pour toute son aide technique et ses mots gentils.

À mes amis du Québec et de la France qui ont suivi de près ou de loin cette aventure à grand renfort d'amour et d'encouragements, je ne pourrais malheureusement pas citer tous mes amis mais sachez que vous avez tous une place de choix dans mon cœur. Plus particulièrement, je tiens à remercier la première personne que j'ai rencontrée au Québec, Mathieu Préau, mon meilleur ami et l'homme qui a été le plus adorable avec moi, tu as été la personne qui a su m'écouter, me conseiller, me divertir, me comprendre sans me juger, m'épauler toujours et encore, je n'aurais pas pu tomber sur une meilleure personne et je ne parle pas de tes petits plats et desserts que tu me cuisinait quand j'étais à bout... Merci profondément d'avoir été là du début à la fin.

A mes deux cortex préfrontaux, Andrée-Ann Baril et Chloé Guillaume. Andrée-Ann, merci d'avoir su inhiber mon amygdale qui s'emballait pour un rien, tu as été là dans les pires moments et je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait, pour ta disponibilité, pour les soupers, pour les crises de rire, pour ton aide dans mon organisation,... Tu es celle qui a probablement le plus suivi tout mon parcours dans mon doctorat, et merci pour tes expressions québécoises, je n'aurais pas pu avoir meilleure professeure ! A ma chère épéiste féministe, Chloé, tu as supporté mes crises de panique irrationnelles tout au long de mon écriture et tu as su me calmer quand j'en avais besoin... Et merci pour ton coup de main pour les figures ! Qu'aurais-je fait sans toi ?!! Merci sincèrement et bravo pour m'avoir supporté si longtemps ! Un grand merci à tous les membres du club d'escrime Lagardère qui m'ont encouragée et qui m'ont permis de me défouler !

À Lisa Boureau, j'ai passé les dimanches après-midis au labo les plus drôles de ma vie, j'ai beaucoup appris de toi, scientifiquement d'abord puis humainement, tu as été là dans des moments difficiles de ma vie et sans toi, je ne sais pas comment j'aurais surpassé tout ça ! Merci pour tous les brunchs qu'on a fait ensemble, c'était un réel plaisir de pouvoir profiter de ces moments avec toi. Et j'ai hâte de te rendre visite à Bordeaux.

À Sophie Pawlowski qui m'a apporté un peu d'Alsace au Québec et qui a cru en moi. A mes amis outre-atlantiques qui m'ont supportée virtuellement notamment Cyril Florimont qui a toujours su comment me rassurer, me redonner confiance quand le moral était au plus bas, et merci pour ton aide pour les corrections de ma thèse. À ma petite « Clemsouille », Clémence Tresch qui m'a témoigné tant d'amour à plus de 6 000 km de distance.

Tout ce parcours n'aurait pas été possible sans le soutien de mes parents Martine et Jean-Claude Freyburger et de mon frère Adrien Freyburger. Ils n'ont pas toujours compris mes choix, mais ils m'ont toujours encouragée dans la voie que j'avais choisie. L'accomplissement de cette thèse symbolise tout ce qu'ils m'ont enseigné dans la vie. Un merci ne sera pas suffisant pour leur exprimer toute ma reconnaissance pour leur soutien et leur amour sans faille qu'ils m'ont témoigné au courant de ces 4 années.

Un dernier mot pour ma grand-mère, qui j'en suis sur aurait été fière de moi comme elle l'a toujours été. Je ne serai pas arrivée où j'en suis aujourd'hui sans la transmission de son caractère bien trempé et de son courage.

Chapitre I - Introduction

Le sommeil est le repos de l'âme et du corps. Il est essentiel au bon fonctionnement du cerveau et de l'organisme. Depuis toujours, le sommeil reste un mystère et il n'a jamais cessé d'alimenter diverses questions: pourquoi dormons-nous ? A quoi sert le sommeil ? Que se passe-t-il dans notre cerveau lorsque nous dormons ? Jusqu'au milieu du XXème siècle, le sommeil était considéré comme un phénomène passif durant lequel l'activité cérébrale est au repos. C'est seulement en 1953 que le chercheur Nathaniel Kleitman renversa ce dogme grâce à ses découvertes sur le sommeil paradoxal (Aserinsky and Kleitman, 1953). Depuis, de nombreuses études ont été menées pour caractériser le sommeil et les scientifiques sont désormais unanimes, le sommeil est le siège de nombreux changements au niveau de l'activité cérébrale, et ces changements semblent être la clé de l'aspect récupérateur du sommeil. Fonctionnellement, les mécanismes qui assurent l'aspect récupérateur du sommeil, appelé l'homéostasie du sommeil, semblent sous-tendre un des rôles les plus importants dans le sommeil. L'homéostasie du sommeil fait intervenir différents acteurs cellulaires et moléculaires qui, selon les hypothèses actuelles, modifient la communication entre les neurones ainsi que la force synaptique. Ces changements dans la communication synaptique semblent être au cœur du processus récupérateur du sommeil.

La plasticité synaptique est un processus important dans la communication neuronale et permet d'induire des changements durables dans les propriétés de transmission de l'information. Actuellement, il existe une controverse dans le domaine du sommeil concernant le rôle de deux types de plasticité différentes dans l'homéostasie du sommeil, la plasticité Hebbienne versus la plasticité non-Hebbienne (Tononi and Cirelli, 2006; Frank, 2012; Tononi and Cirelli, 2012). La plasticité synaptique peut prendre la forme d'une plasticité structurale et/ou fonctionnelle qui induit des changements dans la transmission au niveau de la synapse. La potentialisation à long terme (LTP) en est un exemple majeur (Nicoll and Roche, 2013). Ce phénomène correspond à une modification durable de la force d'une synapse suite à une stimulation (pouvant être chimique ou électrique) d'un neurone pré-synaptique. Dans le cas des synapses excitatrices, cette stimulation pré-synaptique aura pour conséquence de diminuer le

seuil d'excitabilité du neurone post-synaptique lorsqu'une seconde stimulation sera appliquée ultérieurement au neurone pré-synaptique. Cette forme de plasticité est une plasticité de type Hebbienne car elle induit des changements spécifiques au niveau de la synapse qui fait intervenir un neurone pré-synaptique et post-synaptique (pour revue Hebb, 1949; Sejnowski, 1999). Il existe une autre forme de plasticité dite « non-Hebbienne » qui est décrite en terme de plasticité homéostatique. Elle inclut la plasticité au niveau de plusieurs synapses d'un neurone ou encore d'un réseau de neurones dont l'activité augmente ou diminue en fonction des changements globaux de l'activité neuronale (pour revue Burrone and Murthy, 2003; Turrigiano and Nelson, 2004; Turrigiano, 2008). Par exemple, cette plasticité peut être représentée par des changements compensatoires bidirectionnels dans la densité des récepteurs post-synaptique en réponse à des niveaux d'activité globalement élevés ou déprimés ; le « downscaling » est un autre exemple de plasticité non-Hebbienne (Turrigiano et al., 1998).

Les molécules d'adhésion cellulaire sont des acteurs clés dans la communication neuronale et la maturation synaptique. Cependant, le rôle des molécules d'adhésion cellulaire dans le sommeil n'a pas été encore décrit et il fera l'objet de cette thèse. Certaines molécules d'adhésion cellulaire ont été liés à la plasticité Hebbienne et non-Hebbienne (par exemple, Neuroligine-1 est impliquée dans la LTP, tandis que le récepteur EphA4 est impliqué dans la LTP mais également le « downscaling » de l'activité neuronale) et leur étude pourrait donc permettre de clarifier certains volets de l'implication de la plasticité dans la régulation du sommeil. Ainsi, depuis plusieurs années, les scientifiques soutiennent l'hypothèse que le sommeil participe activement à la plasticité synaptique et favorise la consolidation de certaines synapses (Aton et al., 2009; Tononi and Cirelli, 2014)

Dans ce premier chapitre, je vais introduire ce que nous savons aujourd'hui du sommeil en mettant l'accent sur sa régulation, qui fait intervenir différents mécanismes au niveau de régions cérébrales précises. Je me concentrerai ensuite sur deux familles de molécules d'adhésion cellulaire. Dans un second chapitre, j'exposerai les objectifs de ma thèse qui introduiront mes résultats présentés dans un troisième chapitre. Et finalement, je développerai dans un dernier chapitre une discussion générale concernant mes travaux de thèse.

1.1. Le sommeil

1.1.1. Définition et organisation du sommeil

Le sommeil est un état physiologique complexe de par sa manifestation et sa régulation. Le sommeil est très conservé d'un point de vue évolutif, dû à sa fonction de régénération, non seulement chez les mammifères mais également chez tous les vertébrés et chez les espèces invertébrés (Campbell and Tobler, 1984). Nous passons près d'un tiers de notre vie à dormir (Savage and West, 2007; Siegel, 2009). Le sommeil est généralement défini comme un état réversible de quiescence durant lequel les réponses sensorielles à l'environnement sont fortement diminuées et limitées. Le sommeil peut être défini suivant 5 critères (pour revue Zepelin, 2005; Zimmerman et al., 2008) :

- 1- une période de quiescence associée avec une posture spécifique à l'espèce
- 2- une réduction de réponse aux stimuli externes et des changements caractéristiques dans l'activité cérébrale mesurée par électroencéphalographie (EEG)
- 3- une réversibilité rapide à un état d'éveil
- 4- une régulation homéostatique
- 5- une interaction avec l'horloge circadienne et/ou l'expression des gènes de l'horloge

Chez les mammifères, l'enregistrement électroencéphalographique et électromyographique (EEG/EMG) est la méthode la plus standard et commune pour étudier le sommeil. Les électrodes EEG détectent l'activité électrique globale générés par les cellules pyramidales du cortex et dont l'activité est différemment synchronisée en fonction de l'état de vigilance dans lequel se trouve le sujet (Buzsaki et al., 2012). Chez l'humain, les électrodes sont placées sur le cuir chevelu, alors que chez les rongeurs les électrodes sont en contact avec le cortex cérébral (Campbell, 2009). Les électrodes EMG sont généralement placées au niveau du menton pour les humains ou au niveau des muscles du cou pour les rongeurs afin de mesurer l'activité musculaire. L'identification des états de vigilance peut être réalisée manuellement comme cela a été le cas dans les travaux de la présente thèse, et la mesure de l'activité musculaire est essentielle afin de bien identifier les différents stades de sommeil.

Une période de sommeil se compose de deux phases distinctes. La première phase est le sommeil lent ou sommeil à ondes lentes (SOL) caractérisé par une forte activité à ondes lentes (AOL). La deuxième phase est le sommeil paradoxal (SP), décrit ainsi en 1959 par Michel Jouvet, car ce type de sommeil possède des caractéristiques similaires à l'éveil au niveau de l'activité EEG avec une différence notable, une atonie musculaire mesurée grâce à l'EMG (Jouvet, 1965a). C'est durant ce sommeil qu'ont lieu les rêves. Les Anglo-Saxons désignent ce sommeil sous l'appellation de sommeil REM pour « Rapid Eye Movement » car lors de ce sommeil, il survient de nombreux mouvements oculaires rapides sous les paupières closes chez l'humain. Ainsi, par opposition, le sommeil lent est nommé NREM pour « non-Rapid Eye Movement ». Ces deux phases du sommeil alternent avec des phases de micro-éveil lors d'une période de sommeil. Chaque stade de sommeil est associé à une activité cérébrale caractéristique qui nous permet de les identifier (Franken et al., 1998).

Chez les rongeurs, l'éveil est caractérisé par une activité EEG de faible amplitude (de 10 à 30 microvolts (μV) lors d'un éveil averti et de 25 à 60 μV lors d'un éveil calme) et de fréquence variable selon le comportement de l'animal avec la présence d'un tonus musculaire d'amplitude et de fréquence variable également. L'entrée dans le sommeil commence par des épisodes de SOL qui s'installe progressivement. Ce SOL est caractérisé par des ondes de grande amplitude (100 à 200 μV) et basses fréquences, et est dominé au niveau de l'activité EEG par les ondes delta (1-4 Hz, Franken et al., 1998). L'activité musculaire reste faible et stable. À la suite du SOL, l'animal entre dans le SP qui se démarque par la présence d'ondes thêta régulières (6-9 Hz) dans l'EEG et surtout par une atonie musculaire (Figure 1).

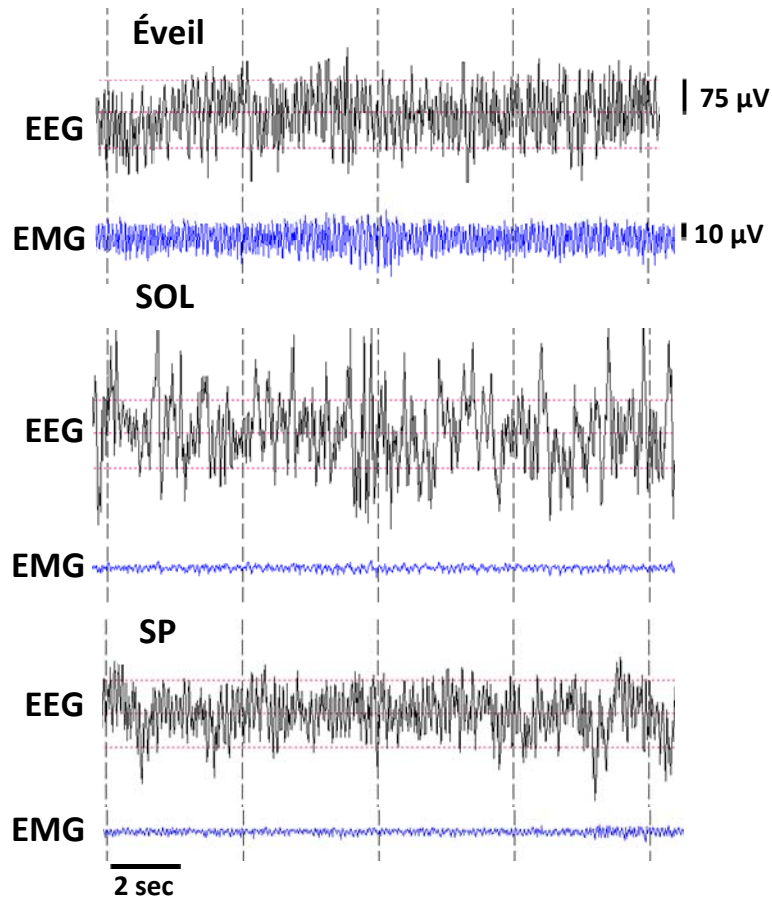


Figure 1: Exemples de signaux EEG/EMG d'éveil, de sommeil à ondes lentes (SOL) et de sommeil paradoxal (SP) chez la souris durant environ 16 secondes. Pendant l'éveil, l'EEG est composé d'un mélange de fréquences de basse amplitude et il y a présence d'un tonus musculaire. Le SOL est caractérisé par des ondes de hautes amplitudes et de basses fréquences (1-4 Hz) avec un faible tonus musculaire. Durant le SP des ondes régulières thêta (6-9 Hz) sont observées alors que l'EMG est plat. (La barre d'échelle pour l'EEG et l'EMG est la même pour les trois états de vigilance).

Chez les mammifères, le sommeil alterne entre le SOL et le SP de manière différente en fonction des espèces. Une période de SOL suivie de SP constitue un cycle de sommeil. Chez l'humain, un cycle de sommeil dure environ 90 minutes et une nuit typique sera constituée de 4 à 5 cycles. Tandis que le sommeil des rongeurs est plus fragmenté avec des cycles de SOL et de SP qui durent entre 10 à 15 minutes (Trachsel et al., 1991; Vivaldi et al., 1994). De manière générale, l'architecture d'un cycle du sommeil change au cours de la nuit. Le sommeil profond avec ses ondes lentes caractéristiques prédomine dans la première moitié de la nuit alors que la durée des épisodes de SP s'allonge avec la progression de la nuit, pouvant durer 30 minutes chez l'humain en fin de nuit (Carskadon, 2011).

1.1.2. La neuroanatomie du sommeil

Le cortex cérébral est une région importante dans la régulation du sommeil. En effet, l'activité globale des neurones pyramidaux du cortex cérébral est visualisée grâce à l'EEG et cette activité corticale évolue suivant l'état de vigilance dans lequel le cerveau se trouve (Kirschstein and Kohling, 2009). Cette activité corticale est influencée par différentes régions sous-corticales que nous allons voir dans cette section. Ces mêmes régions régulent également la transition entre les différents stades de sommeil. Aux cours des dernières décennies, de nombreuses études ont permis d'identifier la circuiterie cérébrale et les neurotransmetteurs qui régulent le sommeil et l'éveil. Le neurologue Von Economo fût le premier à identifier des régions cérébrales responsables de la régulation de l'éveil et du sommeil (Von Economo, 1930). Il proposa que le centre du sommeil se situe dans la partie antérieure de l'hypothalamus tandis que le centre de l'éveil serait situé dans la partie postérieure de l'hypothalamus. Plus tard, Moruzzi et Magoun ont décrit une voie ascendante du maintien de l'éveil située dans la formation réticulée, donnant naissance au « système activateur réticulaire ascendant » (Moruzzi and Magoun, 1949). De ce système émergent deux voies activatrices de l'éveil. La voie principale a pour origine le noyau tegmental latéro-dorsal (LDT) et le noyau pédonculopontin (PTT) dont les neurones cholinergiques innervent directement les noyaux thalamiques dont le noyau réticulaire du thalamus (pour revue Saper et al., 2005; Moore, 2007; Saper et al., 2010; Brown et al., 2012). Ces neurones déchargent rapidement lors de l'éveil et du SP. La deuxième voie du système activateur réticulaire ascendant prend naissance dans la partie dorsale du tronc cérébral et dans la partie caudale de l'hypothalamus. Elle est constituée de neurones monoaminergiques. Cette voie comprend le système noradrénergique du locus coeruleus (LC), sérotoninergique du noyau du raphé, dopaminergique de la substance grise periaqueducule et enfin les neurones histaminergiques du noyau tubéromammillaire (TMN, Saper, 1985; Krout et al., 2002; pour revue Brown et al 2012, Moore et al 2007, Saper et al 2005). Cette deuxième voie est renforcée d'une part via des neurones peptidergiques à orexine (ORX) ou d'hormone de mélanocortine (MCH) de l'hypothalamus latéral, et d'autre part via des neurones cholinergiques du prosencéphale basal (Figure 2A, Gerashchenko et al., 2003 pour revue Brown et al., 2012; Saper et al., 2010).

De plus, ces deux voies activatrices de l'éveil inhibent les neurones du noyau ventrolatéral de l'hypothalamus (VLPO) qui sont actifs durant le sommeil (Szymusiak et al., 1998; Gaus et al., 2002; pour revue Saper et al., 2010). Il a été proposé que le VLPO était un interrupteur du sommeil et promouvait le sommeil. Il est constitué de neurones acide γ -aminobutyrique (GABA) qui sont fortement actifs pendant le SOL et inhibent le système activateur induisant ainsi le sommeil (Sherin et al., 1998; pour revue Brown et al., 2012; Saper et al., 2010). Le VLPO est inhibé lors de l'éveil par le système activateur décrit plus haut (Figure 2B). Il semblerait qu'il y ait une balance entre les régions promotrices de l'éveil et du sommeil. Ils s'inhibent mutuellement et cette balance est responsable du passage entre l'éveil et le sommeil (Saper et al., 2005; Saper et al., 2010). Pendant le SP, des régions cholinergiques et non-cholinergiques du tronc cérébral activent le cortex, alors que l'atonie musculaire associée avec ce stade de sommeil est principalement produite par des projections glutamatergiques et glycinergiques du tronc cérébral sur la moelle épinière (Jouvet, 1965b, 1972; pour revue Andretic et al., 2008).

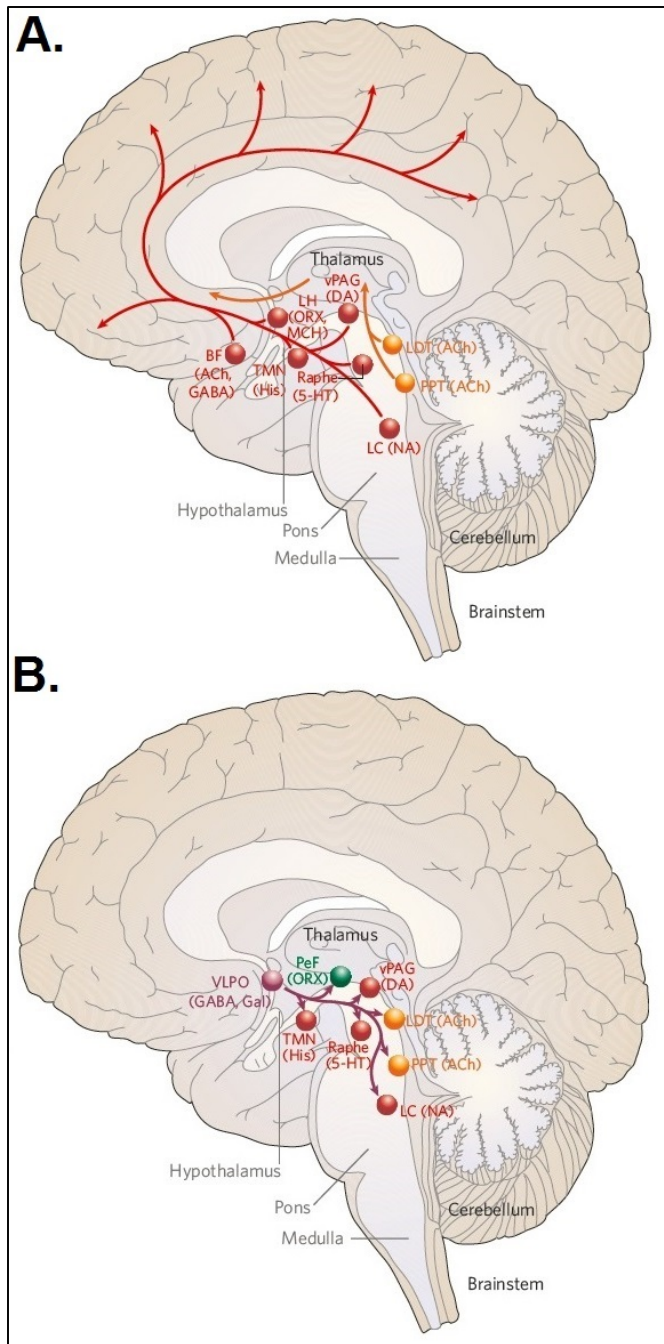


Figure 2 : Vue d'ensemble des voies de neurotransmission impliquées dans la régulation des états de vigilance. **A.** Schéma des acteurs clés du système activateur réticulaire ascendant. Une des voies principales est cholinergique (ACh) et part du noyau tegmental latéro-dorsal (LDT) et le noyau pédonculopontin (PPT) pour innerver le thalamus qui active le cortex (en orange). De plus, des innervations monoaminergiques composées de sérotonine (5-HT) provenant du noyau du raphé (Raphe), de noradrénaline (NA) provenant du locus coeruleus (LC), d'histamine (His) provenant du noyau tubéromammillaire (TMN) et de dopamine (DA) provenant de la substance grise périaqueducale (vPAG) constituent la deuxième voie d'activation du cortex. Cette voie reçoit des innervations de neurones orexinergiques (ORX), d'hormone de mélano-concentration (MCH) de l'hypothalamus latéral (LH) ainsi

que des innervations cholinergiques et GABAergiques (GABA) du prosencéphale basal (BF). **B.** Pendant le sommeil, les projections de GABA et de galanine (Gal) émanant du noyau préoptique ventro-lateral (VLPO) inhibent les principaux noyaux du système réticulaire activateur ainsi que les neurones ORX périfornicaux (PeF, en vert) (image provenant de Saper et al., 2005).

1.1.3. Rôles du sommeil

Le sommeil joue un rôle crucial dans la santé de l'organisme. Un bon sommeil est nécessaire pour la santé physique et mentale (Ohlmann and O'Sullivan, 2009; Krystal, 2012; Jagannath et al., 2013). Au cours des années, différents rôles du sommeil ont été identifiés dans le système immunitaire, le métabolisme de l'organisme ou encore les fonctions cognitives comme la mémoire. Quelles sont les conséquences de la perte de sommeil ? Au départ, on croyait que les conséquences d'un manque de sommeil étaient de la fatigue en journée et des difficultés cognitives, mais nous savons maintenant que l'impact sur la santé est plus important. Le manque de sommeil affecte le fonctionnement général de l'organisme, notamment le déroulement normal des mécanismes immunitaires, et réciproquement, certaines pathologies affectent le sommeil. Par exemple, un manque de sommeil à la suite d'une vaccination réduit l'efficacité du vaccin (Spiegel et al., 2002; Lange et al., 2003) et les personnes souffrant de rhume ou de la grippe ont un sommeil altéré (Drake et al., 2000; Bettis et al., 2006). Le manque de sommeil est également associé à un risque plus élevé d'obésité avec une diminution du niveau de leptine et une augmentation du niveau de ghréline (Taheri et al., 2004). Les maladies cardiovasculaires et l'hypertension ont également été montrées comme étant associées avec le manque de sommeil. Le risque d'une crise cardiaque fatale augmente de 45% chez des individus qui dorment chroniquement 5h par nuit ou moins (Ayas et al., 2003). Ainsi, par ces quelques exemples nous constatons le rôle central du sommeil dans ces maladies et l'importance d'un sommeil de qualité dans la santé des individus.

Le sommeil a un rôle central dans la formation de la mémoire et les capacités cognitives (pour revue Diekelmann and Born, 2010). Depuis les 20 dernières années, de nombreuses études ont lié le sommeil, et spécifiquement certains états de sommeil aux processus cognitifs et à la mémoire (Rasch and Born, 2013). Le sommeil favorise la consolidation de la mémoire et il a été démontré que le sommeil est important dans la consolidation adéquate de la mémoire dépendante de l'activité de l'hippocampe (pour revue Born et al., 2006; Diekelmann and Born, 2010). Une augmentation de l'activité hippocampique a été observée durant le sommeil suivant un apprentissage (Gais et al., 2007). Ainsi lors du sommeil, les processus mnésiques dépendants

de l'hippocampe et responsables de la consolidation de la mémoire sont activés. Le SOL et le SP ont un rôle complémentaire dans les processus de consolidation de la mémoire (pour revue Born et al., 2006; Diekelmann and Born, 2010). En effet, les périodes de sommeil seraient impliquées de manières différentes dans les processus de mémoire. Par exemple, des études menées chez l'humain ont montré que les périodes de sommeil dominées par l'AOL amélioreraient la mémoire déclarative alors que le SP faciliterait la consolidation de la mémoire non-déclarative (Plihal and Born, 1997, 1999). Par ailleurs, il a été montré qu'après un bref épisode de sommeil, lors d'une sieste, la capacité des sujets à effectuer une tâche de mémoire déclarative est augmentée en comparaison à des sujets qui sont restés éveillés (Tucker et al., 2006). Et le pourcentage de SOL durant la sieste montre une corrélation positive avec l'amélioration de la mémoire déclarative ce qui suggère un rôle du SOL dans le traitement de la mémoire déclarative (Tucker et al., 2006). Chez l'humain, l'entraînement à des séquences de tâches motrices augmente le temps passé en SOL ainsi que la densité des fuseaux de sommeil (Morin et al., 2008). Chez l'animal, il a été observé qu'à la suite d'une tâche de labyrinthe, la durée du SP est allongée (Lucero, 1970). Alors qu'une privation de SP après l'apprentissage d'une tâche affecte grandement la mémoire à cette tâche (Smith and Rose, 1996). Une autre étude a montré qu'une fragmentation du sommeil des souris diminue leur capacité à effectuer une tâche de mémoire spatiale telle que la piscine de Morris (Wallace et al., 2015) et qu'une privation de sommeil de 3h suffit à altérer la mémoire nécessaire au succès de la tâche de reconnaissance d'objets (Prince et al., 2014). Ainsi, la privation ou la fragmentation du sommeil affecte différentes formes de mémoire dépendante de l'hippocampe chez les rongeurs, telles que l'évitement passif (Silva et al., 2004), la mémoire spatiale testée grâce à la piscine de Morris (Guan et al., 2004) ou encore la mémoire de peur conditionnée (Graves et al., 2003; Vecsey et al., 2009). Le sommeil joue un rôle primordial dans les fonctions cognitives et la santé générale mais les mécanismes exacts qui interviennent commencent à peine à être élucidés.

1.1.4. Régulation du sommeil par deux processus

L'alternance veille/sommeil obéit à un système de régulation régi par deux processus dont le modèle a été décrit et proposé par Borbély (Borbely, 1982; Daan et al., 1984; Borbely et al., 1989; Achermann et al., 1993; Beersma, 1998). Le premier processus est le processus circadien de la régulation du sommeil ou encore appelé processus « C » qui est responsable de la rythmicité du cycle veille/sommeil et détermine le temps du jour auquel le sommeil doit se produire. Le deuxième processus régulateur du sommeil est le processus homéostatique de régulation du sommeil, ou processus « S », qui contrôle une pression pour le sommeil qui augmente progressivement au cours de l'éveil et diminue durant le sommeil : il reflète le besoin de dormir et détermine l'intensité du sommeil (Daan et al., 1984). Des longues périodes d'éveil induisent une augmentation de l'intensité du sommeil qui s'illustrera par un sommeil subséquent plus profond. En effet, une intensité du sommeil plus grande est nécessaire afin de dissiper l'accumulation de la pression du sommeil. L'intensité du sommeil mesurée par la quantité d'AOL durant le SOL. Une intensité augmentée se reflète au niveau de l'activité EEG par une augmentation de l'AOL (0.75-4.5 Hz) ou de l'activité delta définie de 1-4 Hz selon l'IFCN (« International Federation of Clinical Neurophysiology ») (Steriade et al., 1990). Cette intensité diminue progressivement pendant le sommeil s'illustrant par une diminution de l'AOL pendant le SOL (Borbely, 1982). L'AOL durant le SOL, augmente en fonction de la durée du temps d'éveil qui peut être induite par une privation de sommeil (Dijk et al., 1987). Une privation de sommeil est utilisée pour augmenter la pression homéostatique du sommeil afin de pouvoir évaluer comment le cerveau va relever un défi homéostatique (pour revue Bonnet and Arand, 2003). Ainsi, après une privation de sommeil, on observe une augmentation de l'AOL (ou encore illustré par un rebond dans l'activité delta). La privation de sommeil consiste à garder le sujet éveillé pendant une durée déterminée à un moment dans la journée où le sommeil est naturellement présent. Chez les rongeurs, une privation de sommeil commence habituellement à l'ouverture des lumières (Zeitgeber 0 = ZT0) qui correspond au début de la période de repos de l'animal, un temps du jour auquel la pression du sommeil est élevée.

Les deux processus régulateurs du sommeil influencent la qualité de l'éveil et du sommeil. Une étude a montré qu'en condition de routine constante qui sert à démasquer les

rythmes circadiens endogènes, la vigilance et les performances cognitives augmentent pendant les premières heures qui suivent l'éveil théorique et demeurent stables pendant les 13-14h qui suivent. Mais cette augmentation de la vigilance et des performances cognitives sera moins élevée lors du deuxième jour du protocole de routine constante (Dijk et al., 1992). Ainsi, la vigilance durant l'éveil et les performances cognitives sont influencées par le processus circadien de la régulation du sommeil mais également par l'homéostasie du sommeil.

De plus, ces processus modulent de manière importante l'activité EEG. Par exemple, l'activité spectrale dans les fréquences delta (1-4 Hz) augmente avec la durée de l'éveil (Dijk and Czeisler, 1995) et est donc sous l'influence du processus homéostatique de régulation du sommeil. Contrairement à l'AOL, l'activité qui correspond aux fuseaux de sommeil (12.25-15 Hz) qui a lieu durant le SOL est influencé par les deux processus (Dijk and Czeisler, 1995; Aeschbach et al., 1997). Il a également été démontré que le processus C régule l'initiation du sommeil ainsi que sa durée et que le SP était fortement modulé par le processus C (Carskadon and Dement, 1980; Dijk and Czeisler, 1994, 1995; Wurts and Edgar, 2000). C'est l'interaction entre ces deux processus qui permet à un individu de maintenir l'éveil pendant 16h et de dormir pendant 8h sans interruption (Dijk and Czeisler, 1994, 1995). En effet, au cours de la période d'éveil, la pression pour le besoin de dormir s'accumule mais cette pression est compensée par le processus circadien envoyant un signal d'éveil qui, quelques heures avant le coucher, va atteindre son maximum. De la même manière, lorsque nous dormons, la pression pour le sommeil diminue avec la progression de la nuit alors que la tendance circadienne à l'éveil réapparaît en fin de nuit (Figure 3).

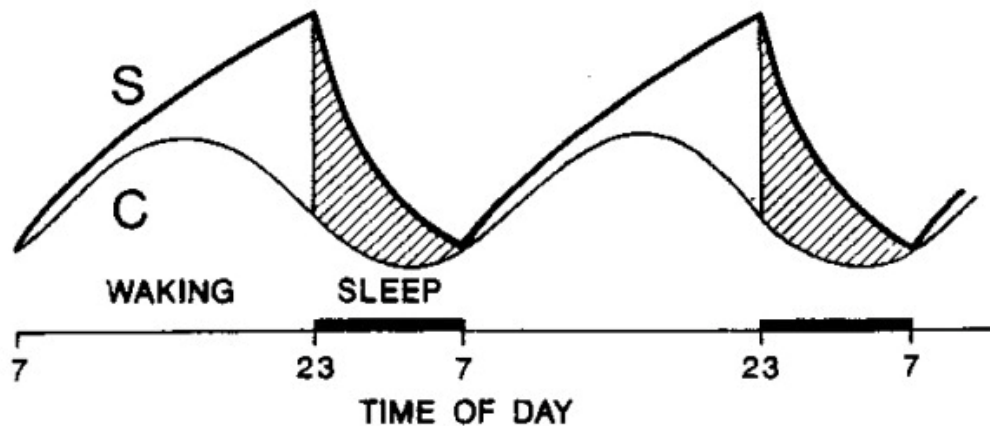


Figure 3: Modèle de régulation du sommeil à deux processus. Interaction entre le processus circadien (C) et le processus homéostatique (S) qui contrôlent les états de vigilance sur deux jours. Le processus S, qui représente le besoin de dormir, augmente logarithmiquement pendant l'éveil jusqu'à ce qu'il atteigne un certain seuil, puis diminue pendant le sommeil. Parallèlement, le processus C oscille en fonction du temps du jour (image provenant de Borbely and Achermann, 1999).

1.1.5. Le processus circadien

Chez les mammifères, le processus circadien prend son origine au niveau des noyaux suprachiasmatiques (SCN) de l'hypothalamus qui sont considérés comme l'horloge principale de l'organisme et qui assurent la synchronisation des rythmes internes en fonction du cycle veille/sommeil (Ralph et al., 1990). Le processus C permet à l'animal de dormir au moment le plus approprié pour sa physiologie. L'activité neuronale des SCN est plus importante pendant la phase de lumière que pendant la phase d'obscurité, et est synchronisée par la lumière via la voie rétino-hypothalamique ce qui permet aux rythmes circadiens d'être en phase avec le cycle lumière-obscurité de l'environnement (Hastings and Herzog, 2004; Silver and Schwartz, 2005). De manière surprenante, le SCN a peu de contact direct avec les systèmes régulateurs de l'éveil ou du sommeil (Watts et al., 1987). Par contre, le SCN projette des innervations dans une région subparaventriculaire ventrale de l'hypothalamus dont les axones innervent le noyau

dorsomédial de l'hypothalamus (Chou et al., 2003; Deurveilher and Semba, 2005). Le noyau dorsomédial contient des neurones GABAergiques qui innervent le VLPO et des neurones glutamatergiques qui vont exciter l'hypothalamus latéral qui appartient au système réticulaire activateur ascendant (Thompson et al., 1996; Chou et al., 2003). Ainsi, à travers différents relais, le SCN va promouvoir l'éveil pendant la période active en inhibant le VLPO et en excitant l'hypothalamus latéral via le noyau dorsomédial.

Au niveau moléculaire, les rythmes circadiens sont entrainés par une machinerie complexe impliquant les gènes de l'horloge. Le produit de ces gènes donne lieu à des régulateurs transcriptionnels impliqués dans une boucle de rétroaction principale qui est constituée d'une activation transcriptionnelle puis d'une inhibition protéique qui génèrent les rythmes d'environ 24h (pour revue Lowrey and Takahashi, 2011). Plus précisément, la boucle d'activation transcriptionnelle est constituée des hétérodimères NPAS2::BMAL1 ou CLOCK::BMAL1 qui activent la transcription des gènes *Period* (*Per1* et -2), et *Cryptochrome* (*Cry1* et -2) par la liaison du complexe CLOCK/NPAS2::BMAL1 sur des séquences consensus de l'ADN appelées « E-Boxes ». Une fois traduites, les protéines PER et CRY forment un complexe protéique qui inhibe la transcription médiée par les hétérodimères CLOCK/NPAS2::BMAL1. En plus de cette boucle principale, d'autres acteurs tels que les récepteurs orphelins REV-ERB et ROR, s'ajoutent et constituent des boucles secondaires qui apportent plus de stabilité à la machinerie (Figure 4).

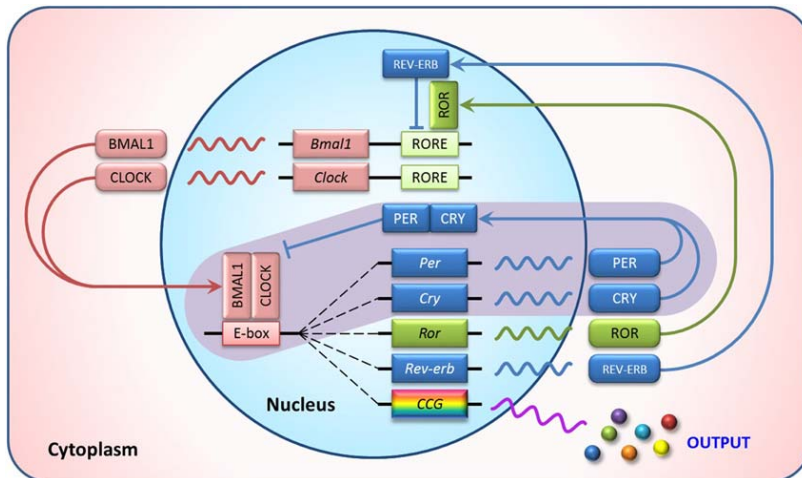


Figure 4 : Boucle transcriptionnelle de l'horloge circadienne chez les mammifères. Dans la boucle principale (encerclée de violet foncé), l'hétérodimérisation des protéines BMAL1 et CLOCK ou NPAS2 (NPAS2 qui est un gène homologue de CLOCK non

représenté dans ce schéma) active la transcription des gènes *Per* et *Cry* via une liaison au niveau de séquences particulières de l'ADN, les « E-boxes », dans leurs régions promotrices. Les protéines PER et CRY s'hétérodimérisent dans le cytoplasme et effectuent une translocation vers le noyau afin d'inhiber le complexe BMAL1/CLOCK, ce qui inhibe leur propre transcription. De plus, il existe des boucles secondaires dont certaines faisant intervenir ROR et REV-ERB qui vont respectivement activer et réprimer la transcription de *Bmal1*. Ces boucles transcriptionnelles-translationnelles contrôlent également l'expression rythmique de nombreux gènes, appelés les gènes contrôlés par l'horloge ou CCG en anglais pour « clock-controlled genes », pour assurer la rythmicité de certaines fonctions biochimiques et de processus moléculaires et physiologiques (image provenant de Chen and Yang, 2015).

Le processus C est également associé à des modifications des éléments cellulaires et moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique. D'une part, des enregistrements multi-unitaires des neurones du SCN ont permis de montrer que l'activité des neurones du SCN est plus importante pendant la période de lumière que pendant la phase d'obscurité des rongeurs et ceci même dans des conditions où il n'y a pas de stimulation photique (Inouye and Kawamura, 1979; Deboer et al., 2003; Brown and Piggins, 2007; pour revue Iyer et al., 2014). D'autre part, les SCN présentent des changements au niveau des synapses glutamatergique sur les neurones à VIP (« peptide intestinal vasoactif ») du SCN avec une augmentation du nombre de synapses glutamatergiques-VIP pendant la phase de lumière correspondant à la phase de

repos chez les rongeurs (Girardet et al., 2010). Au niveau de la plasticité Hebbienne, il a été montré que dans les SCN, la génération de la LTP après une stimulation tétanique était possible uniquement pendant la période de lumière (Nishikawa et al., 1995). Les SCN possèdent également une expression circadienne de certaines sous-unités des récepteurs glutamatergiques ionotropes N-méthyl-D-aspartate (NMDA). L'expression des sous-unités $\epsilon 3$ et $\zeta 1$ chez le rat est plus élevée pendant la période de lumière que pendant la période d'obscurité (Ishida et al., 1994). De plus, une augmentation de l'expression de l'ARNm de la sous-unité NR2B est observée dans les SCN lors de la fin de la période de lumière jusqu'au début de la période d'obscurité et ceci s'accompagne par une augmentation de la phosphorylation des sous-unités des récepteurs NMDA à la fin de la période d'obscurité (Wang et al., 2008). Des changements dans les sous-unités des récepteurs NMDA modifient les propriétés des récepteurs NMDA (Erreger et al., 2005). De plus les neurones du SCN présentent une oscillation circadienne de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+} , Ikeda et al., 2003). Ainsi, ces études suggèrent donc une influence importante du processus circadien sur les mécanismes de la plasticité synaptique.

1.1.5.1 Marqueurs EEG du processus circadien

En condition constante, le maintien de la rythmicité circadienne de certains marqueurs physiologiques connus, a permis d'identifier par la suite les marqueurs EEG du processus C. En effet, l'oscillation circadienne de l'horloge biologique peut être mesurée par trois marqueurs physiologiques: la sécrétion de mélatonine qui est l'hormone centrale de régulation des rythmes circadiens, la température corporelle et la sécrétion de cortisol (Klerman et al., 2002). Ces marqueurs sont utilisés chez l'humain et l'animal pour mesurer le fonctionnement et les propriétés du processus C quand une mesure directe de l'activité des SCN n'est pas possible. Des changements dans ces marqueurs informent si le processus C est modifié ou pas. Ainsi, plusieurs paramètres mesurés au cours du sommeil et de l'éveil sont indicateurs des changements ayant lieu dans la régulation du processus C.

Par exemple, la latence du SP, qui est le temps nécessaire pour rentrer en SP dépendrait plus de l'influence du processus circadien que de la durée de l'éveil précédant le sommeil

(Czeisler et al., 1980). Les paramètres d'architecture du sommeil ayant montré une forte influence circadienne sont la latence à l'endormissement, l'initiation du SP et sa quantité et le temps total de sommeil (Carskadon and Dement, 1980; Czeisler et al., 1980; Dijk and Czeisler, 1994, 1995; Shochat et al., 1997; Lavie, 2001). De telles observations ont également été faites chez les rongeurs, pour lesquels les caractéristiques du SP semblent dépendre du processus C (Wurts and Edgar, 2000; Yasenkov and Deboer, 2010, 2012). De plus, une étude dans laquelle les SCN ont été lésés montre que les SCN favorisent le SP durant la phase de repos des animaux (Wurts and Edgar, 2000). L'analyse spectrale de l'EEG a également montré que l'activité de certaines bandes de fréquence durant le SOL était plus sensible au processus C. Notamment l'activité des bandes de fréquences 12-13 Hz et 14-15 Hz oscille de manière synchrone avec la sécrétion de mélatonine (Aeschbach et al., 1997; Dijk et al., 1997; Knoblauch et al., 2003). De plus, l'activité spectrale dans les fréquences des fuseaux de sommeil qui se retrouve dans la bande d'activité sigma présente une influence circadienne et homéostatique (12.25-15 Hz, Dijk and Czeisler, 1995; Aeschbach et al., 1997). L'activité thêta (6-9 Hz) pendant le SP est fortement influencée par le processus C (Yasenkov and Deboer, 2010). Lors de l'éveil, l'activité des bandes 9.25-12 Hz a présenté une forte influence circadienne qui coïncide avec le rythme endogène de la température corporelle (Aeschbach et al., 1997).

1.1.5.2 Marqueurs moléculaires du processus circadien

Des études utilisant des techniques de quantification de l'expression d'ARNm telles que l'hybridation *in situ* ou encore la PCR quantitative (qPCR) ont montré que tous les gènes de l'horloge présentent une expression rythmique dans les SCN : *Per1* et *Per2* (Albrecht et al., 1997; Shearman et al., 1997), les gènes cryptochromes, *Cry1* et *Cry2* (Miyamoto and Sancar, 1998), tout comme *Clock* (Vitaterna et al., 1994; Gekakis et al., 1998) ou encore *Bmal1* (Abe et al., 1998; Gekakis et al., 1998). Cette rythmicité se retrouve également dans d'autres régions cérébrales que le SCN, telles que le néocortex (Rath et al., 2013). En effet, les gènes *Per*, *Cry1* et *Bmal1* montrent une expression rythmique de l'ARNm dans le néocortex de rat (Rath et al., 2013), mais avec un rythme décalé où le pic d'expression est retardé par rapport au pic d'expression dans le SCN, qui pourrait agir à titre de chef d'orchestre (Abe et al., 1998; Wang et

al., 2006; Rath et al., 2013; Chun et al., 2015). Ces données suggèrent que les gènes de l'horloge possèdent un rôle dans d'autres régions que le SCN de l'hypothalamus et peuvent réguler l'expression de différents gènes impliqués dans des fonctions biologiques propres à la région concernée.

Des études d'expression de gènes par puce à ADN, également « microarray », ont révélé que l'expression de nombreux gènes était contrôlée par les rythmes circadiens dans les SCN (Panda et al., 2002) mais également dans les tissus périphériques tels que le cœur ou le foie, où 575 et 462 gènes présentent respectivement une expression circadienne (Storch et al., 2002). La technique de microarray est une technologie puissante qui permet de mesurer quantitativement et de visualiser très rapidement les différences d'expression entre les gènes et ceci à l'échelle d'un génome complet. L'ADN complémentaire d'un échantillon donné est marqué par un fluorochrome et va s'hybrider à des fragments d'ADN connu fixés sur une puce. En fonction du niveau d'expression d'un gène qui s'hybride à la sonde lui correspondant, l'intensité de la fluorescence émise varie et permet la mesure de l'expression de ce gène de (Iida and Nishimura, 2002). Ainsi, les études d'expression des gènes par microarray ont permis d'identifier de nouvelles et nombreuses voies régulées par l'horloge circadienne. Le contrôle circadien de la transcription permet à chaque tissu ou régions cérébrales d'adopter une physiologie optimale en réponse à l'environnement. Les marqueurs moléculaires permettent de nous renseigner sur l'effet de l'horloge circadienne sur l'expression des gènes.

1.1.6. Régulation du sommeil par le processus homéostatique

Le processus S est basé sur l'histoire du cycle veille/sommeil précédent et semble dépendre, selon les études, de l'activité cérébrale passée (pour revue Campbell and Tobler, 1984; Borbely and Achermann, 1999; Mang and Franken, 2015). Jusqu'à présent la localisation anatomique de ce processus n'a pas été identifiée et serait plutôt diffuse (Dijk and Lockley, 2002). Le processus S a été interprété comme une fatigue cellulaire ou métabolique (Kong et al., 2002), et il a été proposé que ce processus reflèterait un changement dans les propriétés de communication entre les neurones (Krueger et al., 2008). De plus, une hypothèse lie l'homéostasie du sommeil à la plasticité synaptique (Figure 4, pour revue Tononi and Cirelli,

2006). Cette hypothèse suggère qu'un des rôles principaux du sommeil est de diminuer la force des synapses. En effet, cette hypothèse stipule que les connexions synaptiques sont modifiées en fonction de l'éveil et du sommeil et que ce sont ces changements qui sont à l'origine de l'évolution de l'intensité du sommeil. Plus précisément, l'éveil serait associé à une potentialisation synaptique alors que les ondes lentes qui apparaissent lors du SOL sont associées à une diminution de la force synaptique. Toutefois, cette hypothèse fait l'objet de plusieurs critiques (Frank, 2012). Tout d'abord, cette hypothèse se base principalement sur des mécanismes qui sous-tendent la plasticité de type Hebbienne et n'inclut pas de mécanismes liés à la plasticité non-Hebbienne bien que cette dernière soit présentée dans l'hypothèse comme étant à l'origine des changements ayant lieu au cours du sommeil. De plus, les mécanismes moléculaires demeurent encore flous et cette hypothèse ne cadre pas avec l'effet néfaste du manque de sommeil sur la mémoire et l'apprentissage. En effet, certains marqueurs moléculaires de la plasticité synaptique sont diminués avec la durée de l'éveil comme SNAP-25 (Synaptoneurosomal-Associated Protein-25) et Neurogranine (Neuner-Jehle et al., 1995; Basheer et al., 2005) alors que d'autres sont augmentés pendant le sommeil comme Zif268, qui est relié à la LTP et qui est augmenté durant le sommeil suivant un apprentissage au cours de l'éveil précédent (Ribeiro et al., 1999). Il a également été montré que le sommeil promouvait la plasticité corticale après un apprentissage visuel (Aton et al., 2014). Les processus de LTP et LTD ne sont pas restreints à l'éveil et au sommeil, respectivement, mais peuvent être retrouvés autant pendant l'éveil que pendant le sommeil (Timofeev et al., 1996; pour revue Steriade and Timofeev, 2003).

Néanmoins, selon cette hypothèse et plusieurs autres l'ayant précédées, la plasticité neuronale et son organisation semblent être modifiées lors du sommeil, et ces changements peuvent être induits par différentes molécules qu'on identifie comme étant des « substances régulatrices du sommeil » (SRS, pour revue en annexe Rachalski et al., 2014). Dans les sections à venir, nous allons voir le rôle plus détaillé de certaines SRS proposées dans la régulation du sommeil.

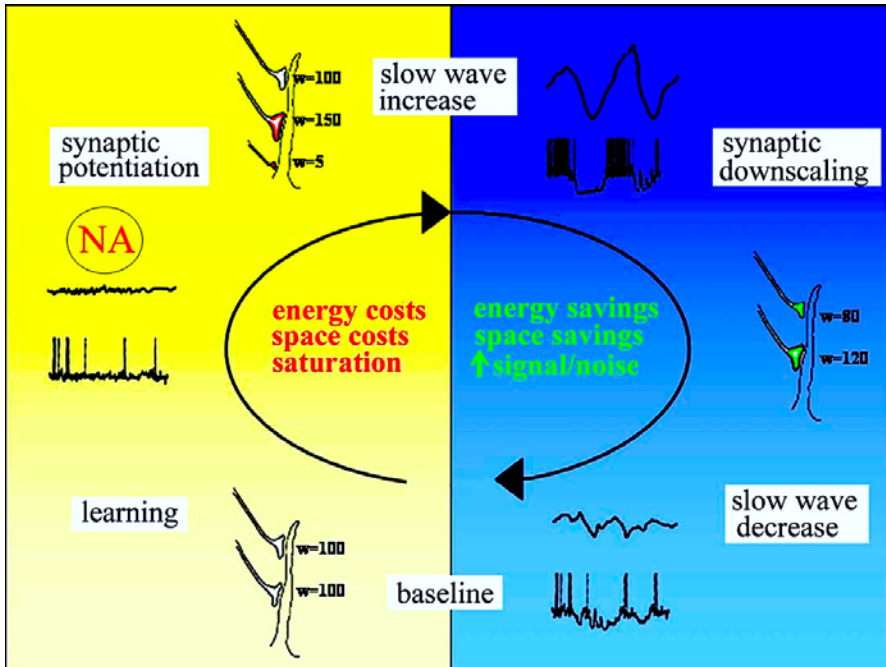


Figure 5: Représentation de l'hypothèse de l'homéostasie synaptique selon Toniai et Cirelli en 2006 : lors de la période d'éveil (en jaune) des connexions synaptiques se forment et se renforcent, notamment via l'apprentissage qui est stimulé par la noradrénaline (NA). Cet

apprentissage pendant l'éveil induit une potentialisation synaptique et donc une augmentation de la force synaptique qui reflète la plasticité de type Hebbienne. Cette activité synaptique est coûteuse en énergie pour les neurones. Au fur et à mesure que l'éveil progresse, la pression pour le sommeil augmente et est représentée par l'activité à ondes lentes qui s'intensifie. Pendant la période de sommeil qui suit (en bleu), il y a une déconnection relative avec l'environnement et la force synaptique diminue tout en conservant une trace des connexions synaptiques établies pendant la journée. Cette diminution ou encore appelé « downscaling » qui représente la plasticité non-Hebbienne, réduit l'activité des ondes lentes qui se dissipent au cours de la nuit. Le système se retrouve alors à un niveau d'excitabilité de base pour pouvoir redémarrer une nouvelle journée (image provenant de Toniai et Cirelli, 2006).

1.1.6.1 Implication de l'adénosine et des cytokines

L'adénosine tri-phosphate (ATP) est l'une des sources principales d'énergie des cellules nerveuses. Elle est hydrolysée en adénosine qui est relâchée par les neurones et les cellules gliales du système nerveux central. Il a été montré que lors de l'éveil ou d'un éveil forcé, l'adénosine s'accumule dans l'espace extracellulaire et augmente les ondes lentes lors du SOL subséquent (Porkka-Heiskanen et al., 1997; Porkka-Heiskanen et al., 2000; Dworak et al., 2010;

Kalinchuk et al., 2011). De plus, il a été montré que l'augmentation de l'adénosine agit sur des récepteurs spécifiques, les récepteurs adénosine A1 (A1R), qui inhibent des neurones activateurs de l'éveil dans le prosencéphale basal et favorisent de cette manière le sommeil (Thakkar et al., 2003; Arrigoni et al., 2006). Dans le VLPO de l'hypothalamus, l'adénosine active des neurones promouvant le sommeil (Gallopini et al., 2005). L'ATP qui s'accumule au cours de l'éveil dans l'espace extracellulaire contribue également à la relâche de cytokines spécifiques par les cellules gliales telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α , Hide et al., 2000; Suzuki et al., 2004). Ainsi, l'adénosine participe à la régulation du sommeil. Les cytokines possèdent également un rôle dans la régulation du sommeil.

Certaines cytokines ont été identifiées comme des modulateurs de l'architecture du sommeil. En effet, une injection systémique ou dans le système nerveux central (SNC) d'interleukine-1 β (IL-1 β) ou de TNF α modifie le SOL en augmentant sa durée, alors que leur inhibition diminue la durée du sommeil (pour revue Krueger, 2008). De plus, l'analyse du sommeil d'animaux mutants qui n'expriment pas les récepteurs du TNF α et de l'IL-1 β montre une diminution de la durée de SOL (Fang et al., 1997; Baracchi and Opp, 2008). Un mécanisme a été proposé afin d'expliquer le lien entre les cytokines et leurs effets sur le sommeil. Il a été démontré que le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF κ B) est activé par les cytokines (Mercurio and Manning, 1999) et ce facteur est impliqué dans la plasticité neuronale (pour revue Salles et al., 2014) et contrôle la transcription de gènes impliqués dans la plasticité synaptique comme le BDNF (« Brain-derived neurotrophic factor ») (Saha et al., 2006). Par ailleurs, le TNF α participe également à la plasticité synaptique en augmentant les courants post-synaptiques excitateurs et agit sur le recrutement à la membrane post-synaptique des récepteurs glutamatergiques ionotropes alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate (AMPA, Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005; Stellwagen and Malenka, 2006) qui jouent un rôle crucial dans la transmission glutamatergique. Bien que le rôle des SRS dans la régulation du sommeil soit bien caractérisé, la compréhension des mécanismes de plasticité synaptique par lesquels ils vont agir sur le sommeil est mal définie, tout comme notre compréhension de la contribution des changements synaptiques dans l'évolution des états de vigilance.

1.1.6.2 Implication des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA

Les récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA ainsi que le glutamate sont des éléments modifiés par les états de vigilance et réciproquement, leurs activités changent la dynamique de certains paramètres du sommeil. Le principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC est le glutamate et l'activation de récepteurs glutamatergiques a un rôle important dans le changement des propriétés de communication entre les neurones. Leur activation mène généralement à une augmentation de l'activité et de la connectivité synaptique (Malinow and Malenka, 2002; Turrigiano, 2008) et ceci module notamment la régulation de l'expression de certains gènes et protéines impliqués dans la plasticité synaptique tels que Abi-1 (« Abelson interacting protein 1 »), NF- κ B, et le facteur de transcription CREB2 (« cyclic AMP-response element-binding protein 2 », Karpova et al., 2012).

Lors de l'éveil, le niveau de glutamate dans le cortex cérébral est élevé alors que, pendant le sommeil, ce niveau diminue (Dash et al., 2009). De plus, une privation de sommeil affecte la LTP, qui est dépendante de l'activité des récepteurs NMDA autant dans l'hippocampe (Campbell et al., 2002; Kopp et al., 2006; McDermott et al., 2006) que dans le cortex cérébral (Romcy-Pereira and Pavlides, 2004; Aton et al., 2009). Chen et collaborateurs en 2006 ont observé chez la souris, qu'une privation de sommeil de 24h induit une augmentation de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA dans le milieu intracellulaire dans l'hippocampe, suggérant une plus grande internalisation du récepteur et donc une diminution de l'expression des récepteurs NMDA à la membrane cellulaire (Chen et al., 2006). Chez le rat, il a été montré qu'une privation de sommeil augmente l'expression protéique de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA au niveau des synapses du cortex cérébral et de l'hippocampe (Vyazovskiy et al., 2008). La dynamique des ondes lentes pendant le SOL dépend de la synchronie entre les neurones corticaux (Steriade et al., 1993a, 1993b) et nous allons revenir plus en détails sur les ondes lentes dans la **section 1.1.6.4**. De manière importante, un changement dans le fonctionnement des récepteurs glutamatergiques ionotropes peut représenter un des mécanismes qui modifie la dynamique de l'activité EEG lors du sommeil. Effectivement, les études indiquent que les propriétés respectives des récepteurs AMPA et NMDA influencent le degré de synchronie neuronale (Harsch and Robinson, 2000; Golomb et al., 2006). De part leur dynamique rapide, les

récepteurs AMPA semblent favoriser la synchronie corticale alors que les récepteurs NMDA dont l'activation est plus lente seraient favorables à la désynchronie de l'activité neuronale corticale comme ce qui se produit lors de l'éveil (Golomb et al., 2006; Paoletti and Neyton, 2007). De plus, il a été montré chez le rat qu'une injection en intrathécale de l'AP-5, un antagoniste des récepteurs NMDA, induit une augmentation de la durée de SOL (Bjorkum et al., 1995). Par ailleurs, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA tels que le MK-801 augmente l'activité delta lors du SOL et prévient la dissipation des ondes lentes qui est la diminution de la quantité d'ondes lentes au cours de la nuit (Campbell and Feinberg, 1996a, 1996b). L'ensemble de ces observations suggère que l'activité des récepteurs AMPA et NMDA est importante dans la régulation homéostatique du sommeil et que les éléments qui contrôlent leur fonctionnement pourraient être impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil.

1.1.6.3 Implication des gènes de l'horloge

Les gènes de l'horloge définissent la rythmicité de l'activité cellulaire par leur oscillation moléculaire dans différents organes. Bien que notre horloge interne soit située dans les SCN de l'hypothalamus, les gènes de l'horloge peuvent agir dans d'autres régions cérébrales et exercer d'autres fonctions. Dans cette section, je vais me concentrer sur la relation entre les gènes de l'horloge et l'homéostasie du sommeil. Des modèles de souris mutantes pour certains gènes de l'horloge ont permis d'identifier un rôle de cette famille de gènes dans l'homéostasie du sommeil (pour revue Franken, 2013; Rachalski et al., 2014). L'analyse EEG de souris mutantes pour les gènes *Cry1* et -2 montre que l'activité delta pendant le SOL est plus élevée et que la durée de SOL présente moins de fragmentation en comparaison à des souris normales (Wisor et al., 2002). Ainsi, ces souris mutantes présentent le phénotype observé lorsqu'une souris est privée de sommeil ; ceci suggère que les gènes *Cry1* et -2 ont un rôle dans l'homéostasie du sommeil. Des modifications dans la dynamique de l'activité delta en condition de base ont également été rapportées dans deux modèles de souris différents. En effet, chez des souris n'exprimant pas *Bmal1*, les données enregistrées en condition basale montrent que la durée de sommeil est augmentée tout comme l'activité delta, et le sommeil présente une fragmentation plus importante que chez des souris sauvages (Laposky et al., 2005). Les souris n'exprimant pas

Npas2 présentent une réponse à la privation de sommeil altérée notamment dans les fréquences basses de l'activité delta (1–2 Hz, Franken et al., 2006). Ainsi, l'absence de *Bmal1* ou *Npas2* affecte la régulation homéostatique du sommeil.

Plusieurs études ont montré qu'une privation de sommeil affecte l'expression des gènes de l'horloge et de gènes contrôlés par l'horloge. En effet, dans le cerveau de souris, l'expression des gènes *Per* est augmentée après privation de sommeil (Franken et al., 2006; Maret et al., 2007; Mongrain et al., 2010; Thompson et al., 2010; El Helou et al., 2013). Le gène *Dbp* dont l'expression dépend des gènes de l'horloge, quant à lui voit son expression diminuée avec la privation de sommeil (Mongrain et al., 2010; Curie et al., 2013). La privation de sommeil affecte également la liaison à l'ADN de CLOCK et BMAL1 sur certains gènes tels que *Per2* ou *Dbp* dans le cortex cérébral de souris (Mongrain et al., 2011b). Ces résultats suggèrent que la quantité de sommeil peut directement affecter le rôle transcriptionnel des produits des gènes de l'horloge. Les éléments de l'horloge possèdent ainsi une fonction de régulateurs de la transcription dont les mécanismes sont plutôt bien caractérisés mais leur implication dans la dynamique de l'activité EEG est moins bien connue. En réponse à la privation de sommeil, les éléments de l'horloge régulent directement ou indirectement l'expression de certains gènes impliqués dans la plasticité neuronale et ceci pourrait modifier l'activité EEG

1.1.6.4 Marqueurs EEG de l'homéostasie du sommeil

Plusieurs réponses moléculaires, comportementales et électrophysiologiques ont été identifiées comme étant des marqueurs fiables de l'homéostasie du sommeil. Lorsqu'on prive un sujet de dormir, le premier signe de la pression de sommeil est justement l'envie de dormir ou somnolence (Roehrs et al., 2006). Cette envie de dormir se reflète dans l'intensité du SOL subséquent et notamment dans l'AOL. Ces paramètres sont des indices du processus S (Achermann et al., 1993; Beersma, 1998; Borbely and Achermann, 1999). L'intensité du SOL peut être étudiée à un niveau comportemental en évaluant la consolidation du sommeil (par exemple la longueur des épisodes de sommeil, le nombre d'éveil pendant le sommeil, Franken et al., 1991; Franken et al., 1999). Tel que décrit dans la **section 1.1.4.**, les marqueurs électrophysiologiques sont principalement utilisés afin de quantifier le processus S. La

dynamique de l'AOL ou de l'activité delta durant le SOL mesurée grâce à l'EEG constitue le marqueur principal du processus S (Achermann et al., 1993; Beersma, 1998; Borbely and Achermann, 1999). En effet, une augmentation du temps d'éveil (au cours de la journée ou après une privation de sommeil) induit une augmentation de l'AOL durant le SOL subséquent (Borbely et al., 1981; Dijk et al., 1993; Landolt et al., 1996), alors que des siestes durant le jour diminuent la quantité d'AOL au cours de la nuit subséquente (Knowles et al., 1990; Feinberg et al., 1992; Werth et al., 1996). Durant le sommeil, cette forte AOL (0.75-4.5 Hz) ou activité delta se dissipe et reflète alors la diminution du processus S.

De plus, les caractéristiques des ondes lentes enregistrées dans l'EEG durant le SOL ont été identifiées comme des marqueurs de la pression du sommeil. Les ondes lentes sont caractérisées par une phase négative et une phase positive. Pendant la phase négative des ondes lentes, les neurones corticaux sont principalement silencieux en état d'hyperpolarisation (période OFF), alors que pendant la phase positive, les neurones déchargent de manière régulière ou par bouffée (Figure 6, Lamarre et al., 1971; McCarley et al., 1983; Steriade et al., 1993a, 1993b). La pente ($\mu\text{V/s}$) des ondes lentes illustre la synchronie des neurones corticaux à entrer dans leur phase de dépolarisation (période ON) ou d'hyperpolarisation (période OFF) en même temps (Steriade et al., 1993b). Plusieurs variables des ondes lentes peuvent être mesurées telles que le nombre, la densité (nb/min) qui correspond au nombre de fois que les neurones passent de la périodes OFF et ON ensemble, l'amplitude (μV), la pente ($\mu\text{V/s}$) entre le pic minimal négatif et le pic maximal positif, la fréquence (Hz) et la durée de la période ON et OFF. Une étude a montré qu'une grande amplitude des ondes lentes était reliée à une plus grande population neuronales synchrones (Nir et al., 2011).

Plusieurs études ont montré que sous une pression de sommeil élevée (après une privation de sommeil par exemple) les propriétés des ondes lentes étaient modifiées (Esser et al., 2007; Vyazovskiy et al., 2009; Carrier et al., 2011; Mongrain et al., 2011a). Une étude menée chez l'humain montre qu'un éveil prolongé de 40h augmente le nombre, la pente, l'amplitude et la fréquence des ondes lentes lors du sommeil de récupération, comparativement au sommeil de base (Bersagliere and Achermann, 2010). Alors que pendant le sommeil, la dynamique des

ondes lentes par exemple leur densité est diminuée (Riedner et al., 2007; Vyazovskiy et al., 2009; Carrier et al., 2011). Des études menées chez le rat et chez l'humain ont montré que la pente des ondes lentes est plus raide après un éveil prolongé (Vyazovskiy et al., 2009; Carrier et al., 2011; Mongrain et al., 2011a). Le cortex cérébral semble être le principal contributeur des ondes lentes (Steriade et al., 1993a, 1993b). De plus, la synchronie neuronale (la pente des ondes lentes) s'atténue avec la diminution de la pression homéostatique du sommeil. La dynamique de la synchronie neuronale au cours du sommeil mesurée par la pente des ondes lentes a été proposée comme un modulateur de la plasticité synaptique (Tononi and Cirelli, 2006; Riedner et al., 2007).

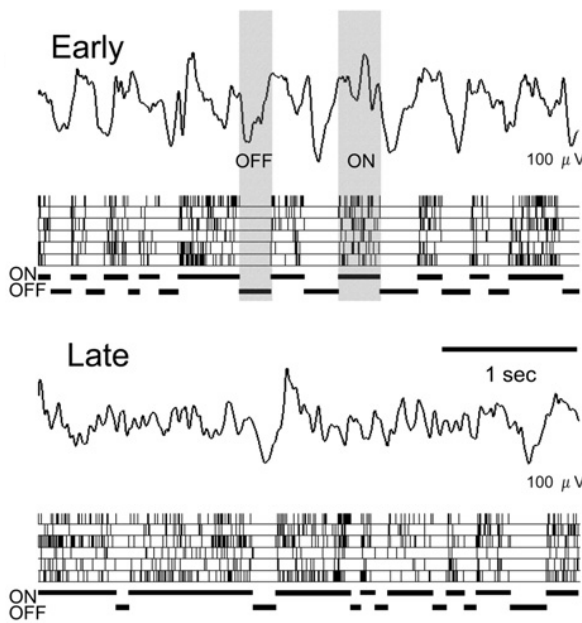


Figure 6: Tracée EEG et raster plots de l'activité neuronale pendant du SOL en début (Early) et en fin (Late) de période de repos chez un rat. On peut constater que le nombre de périodes de dépolarisation (période ON) et les périodes d'hyperpolarisation (période OFF) diminue avec la progression du sommeil (image provenant de Vyazovskiy et al., 2009).

Ainsi, l'étude des caractéristiques des ondes lentes est un outil supplémentaire permettant de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'aspect récupérateur du sommeil. Durant l'éveil, il existe d'autres marqueurs électrophysiologiques tels que l'activité thêta (6-9 Hz) qui voit son activité augmentée pendant un éveil prolongé (Finelli et al., 2000). L'activité sigma (12-16 Hz chez l'humain, 10-13 Hz chez le rongeur) est également considérée comme un marqueur homéostatique (Landolt et al., 2004; Tinguely et al., 2006). L'activité sigma

lors du SOL est inversement associée avec la pression homéostatique du sommeil, c'est-à-dire qu'elle augmente au cours du sommeil et diminue lors de l'éveil prolongé (Aeschbach and Borbely, 1993; Dijk et al., 1993; Dijk and Czeisler, 1995; Aeschbach et al., 1997; Dijk et al., 1997; Landolt et al., 2000; Knoblauch et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que des mini-bandes de fréquences spécifiques dans l'activité sigma sont des marqueurs d'une influence circadienne ou homéostatique chez l'humain (Aeschbach et al., 1997; Dijk et al., 1997) comme chez les rongeurs (Yasnikov and Deboer, 2010, 2011). Par exemple chez l'humain, dans la bande de fréquence des fuseaux, tel que mentionné dans la **section 1.1.5.1.**, il y a une plus forte influence du processus circadien dans les mini-bandes de fréquences de 12.25-13 Hz et 14.25-15 Hz alors que la mini-bande de fréquence 13.25- 14 Hz serait plus régulée par le processus homéostatique de la régulation du sommeil (Dijk et al., 1997).

1.1.6.5 Marqueurs moléculaires de l'homéostasie du sommeil

D'un point de vue moléculaire, l'expression de nombreux ARNm dans le cerveau est modifiée avec la pression homéostatique au sommeil. Ces changements moléculaires peuvent également être des marqueurs de la pression du sommeil (Mongrain et al., 2010; El Helou et al., 2013). L'expression de nombreux gènes de réponse immédiate est augmentée lors d'une privation de sommeil, tels que *Arc*, *Fos*, *Bdnf*, etc... (Maret et al., 2007; Mackiewicz et al., 2008; Thompson et al., 2010). Notamment le gène *Homer1a* qui encode une protéine synaptique est reconnu comme étant un des meilleurs marqueurs moléculaires pour la pression homéostatique du sommeil (Franken et al., 2001; Maret et al., 2007). Des études de l'expression des gènes de l'horloge par qPCR montrent que la privation de sommeil modifie également l'expression de certains gènes de l'horloge tels que les gènes *Per* et *Dbp* (Wisor et al., 2002; Franken et al., 2007). De plus, les études de microarrays ont dessiné le portrait global de l'effet de la privation de sommeil sur le transcriptome. Une privation de sommeil modifie plusieurs centaines à plusieurs milliers de transcrits dans le prosencéphale de souris (Mongrain et al., 2010). Ces études ont permis de conforter certaines hypothèses selon lesquelles le sommeil a un rôle dans différentes fonctions biologiques comme le métabolisme lipidique, la biosynthèse protéique ou encore la plasticité synaptique (Maret et al., 2007; Mongrain et al., 2010; Massart et al., 2014;

pour revue Mackiewicz et al., 2009)

Ainsi, grâce aux études de microarray, il a été établi que la privation de sommeil affecte l'expression de nombreux gènes impliqués dans des fonctions biologiques différentes, mais aucune étude n'a été effectuée sur la régulation de l'expression des gènes par les mécanismes épigénétiques tels que la méthylation ou l'hydroxyméthylation de l'ADN, qui représentent des mécanismes importants de régulation transcriptionnelle. Les marques épigénétiques réagissent aux changements de l'environnement et régulent l'expression des gènes en permettant ou non d'induire les mécanismes de transcription (Graff et al., 2012; Cortes-Mendoza et al., 2013). Par ailleurs, les mécanismes épigénétiques sont sensibles à l'activité neuronale (Guo et al., 2011a) et ont été identifiés comme ayant un rôle dans la régulation de la plasticité de type Hebbienne et non-Hebbienne (pour revue Guzman-Karlsson et al., 2014). Il serait donc important d'étudier l'effet d'une privation de sommeil sur la distribution globale de ces marques épigénétiques dans le cortex cérébral, région impliquée dans la régulation du sommeil.

Nous avons pu voir que pendant le sommeil des changements dans la plasticité synaptique ont lieu et que certains éléments impliqués dans la plasticité synaptique pourraient modifier la régulation du sommeil. Bien que les marqueurs de l'homéostasie du sommeil ont permis de mieux comprendre les propriétés du processus homéostatique de la régulation du sommeil, les mécanismes moléculaires ayant lieu au niveau de la synapse pendant le sommeil et pour le sommeil demeurent mal compris. Dans cette thèse, nous avons étudié la contribution d'une classe particulière de molécules régulant le fonctionnement neuronal, dans le contrôle moléculaire et électrophysiologique du sommeil : les molécules d'adhésion cellulaire.

1.2. Les molécules d'adhésion cellulaire

Dans le cerveau, les molécules d'adhésion cellulaire sont responsables du maintien mécanique des contacts synaptiques et permettent la reconnaissance entre les cellules. Elles participent à l'organisation fonctionnelle et structurale de la synapse de par leur implication dans l'assemblage de molécules de signalisation, des récepteurs aux neurotransmetteurs ou encore dans le recrutement du cytosquelette d'actine (Fields and Itoh, 1996; Cotman et al., 1998; Bukalo and Dityatev, 2012; Missler et al., 2012). Ces molécules ne sont pas uniquement impliquées dans l'échafaudage physique de la synapse mais possèdent également un rôle déterminant dans la fonction de certains récepteurs membranaires des neurones (Fields and Itoh, 1996; Cotman et al., 1998; Bukalo and Dityatev, 2012; Missler et al., 2012). La fonction et la spécificité de ces molécules sont affectées dans un grand nombre de maladies neurologiques caractérisées par un dysfonctionnement de la synapse telles que l'autisme, la schizophrénie, ou les troubles cognitifs retrouvés chez les personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer (Bukalo and Dityatev, 2012; Shishido, 2012; Mackowiak et al., 2014; Sindi et al., 2014).

La Neuroligine-1 (Nlgn1 ou NLGN1) et le récepteur EphA4 (EphA4) font parties de deux familles de molécules d'adhésion cellulaire qui sont impliquées différemment dans la plasticité synaptique comme il sera décrit ci-après. La plasticité synaptique modifie la communication neuronale et elle peut impliquer des changements structuraux (illustrés par la rétraction des épines dendritiques par exemple) et fonctionnels comme la LTP. Les modifications de l'expression de certains récepteurs membranaires, des changements dans l'organisation du cytosquelette, la génération de nouvelles épines dendritiques ou encore la participation de molécules d'adhésions dans la maturation des synapses contribuent à la plasticité synaptique (Nusser et al., 1998; Fukazawa et al., 2003). Concernant les molécules d'adhésion cellulaire, il a notamment été montré qu'elles participaient activement à la formation, la maturation et à la potentialisation de l'efficacité de la transmission synaptique (pour revue Bukalo and Dityatev 2012). Ces molécules sont donc des candidates potentielles dans les modifications synaptiques qui interviennent dans les processus de régulation du sommeil.

1.2.1. La famille des neuroligines

1.2.1.1. Description de la famille des neuroligines

Les neuroligines (NLGNs ou NLGs) constituent une famille de molécules d'adhésion cellulaire qui interagissent trans-synaptiquement avec des protéines appartenant à la famille des neurexines (Ichtchenko et al., 1995). Chez les rongeurs, la famille des NLGNs est constituée de 4 gènes *Nlgn1*, *2*, *3* et *4* (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996; Bolliger et al., 2008) alors que chez l'humain on en a été répertorié 5 : *Nlgn1*, *2*, *3*, *4*, *4Y* (Bolliger et al., 2001; Jamain et al., 2003). Par contre, 3 gènes sont présents dans la famille des NRXs chez les mammifères (*NRXN1*, *NRXN2* et *NRXN3*), chaque gène est contrôlé par deux promoteurs différents ce qui aboutit à deux formes de NRX, NRX- α et NRX- β (Baudouin and Scheiffele, 2010; Bukalo and Dityatev, 2012). Les NLGNs sont essentielles au bon fonctionnement des synapses et du cerveau, et cela s'appuie sur le fait que des mutations de type perte de fonction chez l'humain pour les gènes *NLGN3* et *NLGN4* conduisent à un retard mental comme l'autisme (Jamain et al., 2003; Chih et al., 2004; Comoletti et al., 2004).

1.2.1.2. Structure et localisation de *Nlgn1*

De manière similaire aux NRXs, les NLGNs sont des protéines membranaires de type I qui possèdent un long domaine amino-terminal (N-terminal) extracellulaire qui peut être glycosylé (Ichtchenko et al., 1995). Ce long domaine N-terminal est suivi par un seul domaine transmembranaire et enfin, d'un court domaine carboxy-terminal (C-terminal) intracellulaire. A l'extrémité du domaine N-terminal, un peptide signal est suivi d'un domaine cholinestérase qui crée des ponts disulfures et confère la structure tri-dimensionnelle de NLGN1 (Ichtchenko et al., 1995). Au niveau signalisation intracellulaire, à son extrémité C-terminale, NLGN1 possède un motif PDZ (« Postsynaptic density Disc large Zona occludens ») qui permet la liaison de NLGN1 avec deux protéines importantes dans l'architecture post-synaptique, la protéine PSD-95 (« PostSynaptic Density protein 95 ») et S-SCAM (« Synaptic SCAffolding Molecule », Irie et al., 1997; Hirao et al., 1998). Ces protéines lient NLGN1 avec des protéines post-synaptiques dont

les récepteurs NMDA. La protéine S-SCAM joue un rôle dans l'échafaudage et la transmission glutamatergique au niveau post-synaptique (Danielson et al., 2012) et interagit avec les récepteurs NMDA et NLGN1 (Iida et al., 2004). La protéine PSD-95 est également une protéine connue pour être impliquée dans l'assemblage et l'organisation de différentes protéines au sein des densités postsynaptiques (Kornau et al., 1997). Le couplage de NLGN1 à PSD-95 induit le recrutement d'autres protéines post-synaptiques incluant des récepteurs aux neurotransmetteurs, le cytosquelette d'actine et des molécules de signalisation intracellulaires, qui sont des éléments clés dans la plasticité structurelle et fonctionnelle de la synapse (Kim and Sheng, 2004). Un des partenaires de NLGN1 est NRX1 β (Song et al., 1999; Tallafuss et al., 2010). La liaison entre NLGN1 et NRX1 β forme un hétérodimère et une étude de chromatographie par affinité a permis de mettre en évidence que cette interaction est régulée par la concentration d'ions calcique et qu'elle n'est pas possible lorsque le Ca²⁺ est absent (Nguyen and Sudhof, 1997). Le Ca²⁺ est un élément fondamental dans la plasticité synaptique.

L'étude de la localisation de la famille des NLGNs et des NRXs a révélé que NLGN1 est située principalement sur la membrane post-synaptique de synapses excitatrices tandis que NLGN2 est exprimé au niveau de synapses inhibitrices (Song et al., 1999; Chih et al., 2006). Alors que NLGN1 se lie avec PSD-95, NLGN2 s'associe au niveau de la membrane post-synaptique avec la protéine géphyrine, protéine d'ancrage au niveau des synapses inhibitrices. Les NRXs sont retrouvées au niveau pré-synaptique (Figure 7, Song et al., 1999; Tallafuss et al., 2010). Nlgn1 est localisée dans tout le cerveau, et elle est principalement exprimée dans le cortex cérébral et l'hippocampe (Song et al., 1999). L'étude de l'expression de l'ARNm par hybridation *in situ* de *Nlgn1*, 2 et 3 chez les rats nouveaux-nés et adultes montre que les 3 neurologines sont exprimées dans le cortex, le striatum, le tronc cérébral, l'hypothalamus et le thalamus. De plus, leurs niveaux d'expression augmentent avec le développement ce qui met en lumière un rôle des NLGNs dans le développement et la maturation neuronale (Varoqueaux et al., 2006).

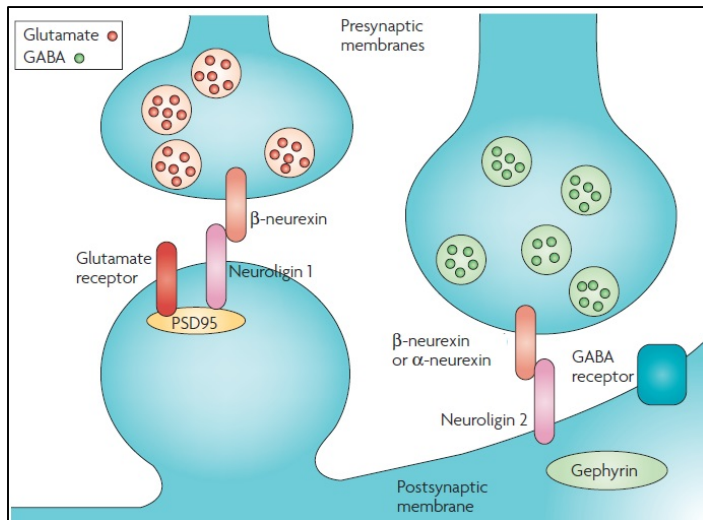


Figure 7: Schéma représentant la localisation de Nlgn1 et Nlgn2 respectivement au niveau de synapses excitatrice et inhibitrice. Nlgn1, exprimée aux synapses excitatrices, peut interagir avec $Nrx\beta$ ce qui stabilise la communication entre les deux neurones. Au niveau de la membrane postsynaptique, Nlgn1 se lie au récepteur

glutamatergique via la protéine PSD-95. Nlgn2 peut se lier avec les $NRX\alpha$ et $-\beta$ aux synapses inhibitrices. Leur liaison induit le regroupement de géphyrine et des récepteurs GABAergiques (image adaptée avec permission et provenant de Li et al., 2007).

1.2.1.3. Les variants de transcription de Nlgn1

Nlgn1 subit un épissage alternatif qui génère différentes isoformes de NLGN1 ce qui va déterminer sa liaison avec les NRXs ainsi que sa localisation (Ichtchenko et al., 1995; Chih et al., 2006). Ces différents variants de transcription de *Nlgn1* sont caractérisés par la présence ou l'absence de deux inserts : l'insert A et l'insert B. Il existe donc dans le système nerveux central, un premier isoforme de *Nlgn1* contenant les deux inserts (Nlgn1AB), un deuxième isoforme ne contenant aucun des inserts, un troisième isoforme contenant uniquement l'insert A (Nlgn1A), et un quatrième isoforme contenant uniquement l'insert B (Nlgn1B). La présence de l'insert A semble être responsable de la localisation de Nlgn1 au niveau de synapses de type inhibitrice (GABA), alors que l'insert B est important dans le rôle de Nlgn1 au niveau des synapses excitatrices (glutamatergiques, Chih et al., 2006). Ceci pourrait être dû à la structure carbohydrate de l'insert B qui empêcherait Nlgn1 d'induire la formation de synapses GABAergiques (Chih et al., 2006). L'absence de l'insert B favorise les interactions de Nlgn1 avec

les NRX α par rapport aux autres isoformes (Boucard et al., 2005). Ainsi, les différents variants de transcription de *Nlgn1* lui confèrent des fonctions différentes.

1.2.1.4. Rôle de *Nlgn1* dans la synaptogénèse

La présence ou l'absence de *Nlgn1* module les courants synaptiques dépendant des récepteurs NMDA (Chubykin et al., 2007). Mais en ce qui concerne la régulation du nombre et la structure des synapses excitatrices, le rôle de *Nlgn1* n'est pas clair. En effet, les résultats de certaines études semblent contradictoires. Lorsque *Nlgn1* est exprimée dans des cellules non-neuronales cela induit la formation de synapse suggérant que *Nlgn1* est intrinsèquement synaptogénique (Scheiffele et al., 2000; Nam and Chen, 2005). Dans des neurones en culture, la surexpression de *Nlgn1* augmente le nombre de synapse glutamatergique alors que son inhibition par l'utilisation d'ARN d'interférence le diminue (Chih et al., 2005; Levinson and El-Husseini, 2005; Chubykin et al., 2007). Une étude sur des souris triples knock-out (KO) pour *Nlgn1*, *Nlgn2* et *Nlgn3* montre qu'en dépit d'une mort périnatale (24h après la naissance), les souris triples KO ne présentent pas de perturbation dans le nombre des synapses ou encore dans l'ultra-structure des synapses (Varoqueaux et al., 2006). Malgré que des déficits dans la transmission synaptique aient été rapportés dans l'hippocampe et l'amygdale lorsque *Nlgn1* n'est pas exprimée, le nombre de synapse reste le même (Kim et al., 2008; Blundell et al., 2010). Ainsi, des études où l'expression de *Nlgn1* est manipulée en *ex vivo* semblent indiquer que *Nlgn1* régule la formation des synapses, leur nombre et la formation d'épines dendritiques alors qu'à l'inverse, les études *in vivo* ou à partir de tissus d'animaux KO ne soutiennent pas cette observation. Kwon et collaborateurs en 2012, propose que cette contradiction peut s'expliquer par le fait que c'est la différence dans le niveau d'expression de *Nlgn1* avec les neurones voisins qui détermine l'effet synaptogénique de *Nlgn1* (Kwon et al., 2012). En effet, l'action synaptogénique de *Nlgn1* est effective lorsque deux neurones adjacents, n'ont pas le même niveau d'expression pour *Nlgn1*, mais si tous deux ont un niveau élevé ou bas de *Nlgn1* l'action synaptogénique ne pourra pas s'exercer.

1.2.1.5. Rôle de *Nlgn1* dans la transmission glutamatergique

Nlgn1 possède un rôle déterminant dans la transmission synaptique glutamatergique de par sa localisation spécifique sur les membranes post-synaptiques excitatrices, et de par son interaction avec la protéine PSD-95 qui lui confère ainsi une co-localisation avec le récepteur NMDA (Irie et al., 1997; pour revue Missler et al., 2012). De nombreuses études ont été menées dans le but de caractériser le rôle de *Nlgn1* à la synapse glutamatergique. Des souris dont l'expression de *Nlgn1* était altérée, présentent des déficits dans la transmission et la plasticité synaptique médiées par les récepteurs NMDA. En effet, en utilisant des ARNs d'interférence dirigés contre *Nlgn1* dans l'amygdale latérale, Kim et collaborateurs ont démontré que les courants post-synaptiques excitateurs médiés par les récepteurs NMDA étaient significativement diminués comparativement aux souris contrôles, et que la présence de NLGN1 est essentielle pour le développement normal de la LTP et la rétention de la mémoire de peur conditionnée (Kim et al., 2008). De plus, chez des souris mutantes pour *Nlgn1* on observe spécifiquement une diminution de la LTP aux connexions entre le thalamus et l'amygdale et non aux connexions cortex-amygdale (Jung et al., 2010). Des études *in vitro*, ont également montré que des déficits dans la génération de la LTP sont observés, lors de la délétion de *Nlgn1*, dans les collatérales de Schaffer dans la région CA1 de l'hippocampe (Blundell et al., 2010; Shipman and Nicoll, 2012). Par ailleurs, dans l'hippocampe, l'absence de *Nlgn1* induit une hyperexcitabilité des circuits de l'hippocampe en affectant l'équilibre des synapses excitatrices et inhibitrices via un déficit de génération de la LTP par la voie perforante sur les cellules granulaires (Jedlicka et al., 2015). Une surexpression de *Nlgn1* dans des neurones en culture augmente la densité des synapses excitatrices, alors que la délétion de *Nlgn1* chez des souris KO pour *Nlgn1* présente une diminution de la pente des courants post-synaptiques excitateurs (Chubykin et al., 2007). L'absence de *Nlgn1* ne va pas seulement altérer la fonction synaptique et la transmission glutamatergique, mais des neurones exprimant pas *Nlgn1* voient l'organisation de leurs synapses alérée notamment au niveau de leur densité post-synaptique (Zeidan and Ziv, 2012). Non seulement l'absence mais également une surexpression de *Nlgn1* en *in vivo* va induire une diminution de la pente des potentiels post-synaptiques excitateurs dépendants des récepteurs

NMDA (Dahlhaus et al., 2010). En somme, il semble que Nlgn1 soit impliquée dans la plasticité synaptique fonctionnelle et également dans la formation de synapses.

1.2.1.6. Effet de l'absence de Nlgn1 sur la régulation du sommeil

Dans les sections précédentes, nous avons mise en évidence le rôle de Nlgn1 dans la transmission glutamatergique ainsi que dans la plasticité synaptique. Bien que les souris KO pour *Nlgn1* (*Nlgn1*^{-/-}) soient viables et ne semblent pas avoir de déficits majeurs (Varoqueaux et al., 2006), des études ont montré que l'absence de *Nlgn1* affectait la mémoire et la transmission glutamatergique notamment la LTP (Kim et al., 2008; Blundell et al., 2010; Jung et al., 2010). Ces effets sont également retrouvés lors d'un manque de sommeil. De manière intéressante, une mutation de type délétion de *Nlgn1* a des effets similaires à ceux de la privation de sommeil sur la mémoire et le comportement (Kim et al., 2008; Blundell et al., 2010). De plus, une privation de sommeil diminue l'expression de l'ARNm de *Nlgn1* (Wang et al., 2010). Nlgn1 possède un rôle important dans l'activité et la plasticité neuronale, et son absence conduit à des déficits dans les fonctions cognitives comme la mémoire, qui sont semblables aux effets de la privation de sommeil sur les capacités cognitives. Ainsi, Nlgn1 dont l'expression est diminuée avec la privation de sommeil, peut être un candidat potentiel dans les mécanismes de régulation du sommeil.

Au sein du laboratoire du Dr Valérie Mongrain, nous avons étudié l'effet de l'absence de Nlgn1 sur l'architecture du sommeil ainsi que l'effet d'une privation de sommeil sur l'expression de *Nlgn1* (El Helou et al., 2013). La structure du sommeil des souris *Nlgn1*^{-/-} est affectée de manière à ce que les souris *Nlgn1*^{-/-} ont de la difficulté à maintenir l'éveil. En effet, les souris *Nlgn1*^{-/-} ont une durée d'éveil diminuée et une augmentation de la durée de SOL, plus particulièrement elles passent plus de temps en SOL durant les deux premiers tiers de la période d'obscurité durant laquelle les souris sont généralement actives. De plus, la durée individuelle des épisodes d'éveil est plus courte chez les souris mutantes que chez les souris *Nlgn1*^{+/+} (El Helou et al., 2013). L'analyse spectrale qui renseigne sur la qualité des états de vigilance montre

que, pendant l'éveil, les souris *Nlgn1*^{-/-} ont une diminution dans l'activité delta et thêta ainsi que dans l'activité alpha (8-10 Hz). Pendant le SOL, les souris *Nlgn1*^{-/-} ont une tendance à avoir une activité delta plus élevée que les souris *Nlgn1*^{+/+} (El Helou et al., 2013). Afin d'étudier le rôle de Nlgn1 dans l'aspect récupérateur du sommeil, les animaux ont été privés de sommeil pendant 6h. Après la privation de sommeil, les souris *Nlgn1*^{-/-} avaient une activité delta significativement plus importante que les souris *Nlgn1*^{+/+} et elles présentaient des difficultés à récupérer leur manque de sommeil. Ces résultats suggèrent que Nlgn1 est nécessaire au maintien de l'activité neuronale corticale pendant l'éveil et le SOL, et que son absence amplifie la synchronie corticale après une privation de sommeil (El Helou et al., 2013).

Un autre membre de la famille des NLGNs été identifié comme ayant un rôle dans la régulation du sommeil. Une étude chez la drosophile montre que les drosophiles n'exprimant pas *Nlgn4*, appelé *DNlg4* chez la drosophile, ont une durée de sommeil diminuée et une latence à l'endormissement plus grande (Li et al., 2013). De plus, les drosophiles mutantes pour *DNlg4* présentent un plus grand nombre d'épisodes individuels de sommeil mais de durée plus courte que celle des mouches sauvages (Li et al., 2013) ce qui montre une fragmentation plus élevée des états de vigilances. Ainsi dans cette étude, ils ont montré que *Nlgn4* promouvait le sommeil chez la drosophile.

A la suite des observations faites sur l'activité delta des souris *Nlgn1*^{-/-}, nous avons émis l'hypothèse que l'activité delta altérée se traduirait par des modifications spécifiques des caractéristiques des ondes lentes individuelles telles que l'amplitude, la pente, la durée de la phase positive et négative. Plus précisément, comme nous observons un rebond d'activité delta plus élevée chez les souris *Nlgn1*^{-/-} que chez les souris *Nlgn1*^{+/+} nous pensons que chez ces souris la pente des ondes lentes sera augmentée car la pente des ondes lentes est corrélée avec un rebond dans l'activité delta. En effet, la pente des ondes lentes est augmentée tout comme l'amplitude après privation de sommeil et cela a été montré dans plusieurs études chez l'humain et les rongeurs (Vyazovskiy et al., 2009; Carrier et al., 2011; Mongrain et al., 2011a). Les autres paramètres des ondes lentes tels que la durée de la phase positive et négative ou encore la densité sont également modifiées après une privation de sommeil mais leur

caractérisation est moins bien définie. En effet, des résultats opposés concernant l'effet d'une privation de sommeil sur la durée des phases négatives et positives ont été observés chez les rongeurs et chez l'humain. En effet, une étude chez le rat a montré que la pression pour le sommeil augmentait la durée de la phase positive des ondes lentes (Vyazovskiy et al., 2009). Mais des études chez l'humain ont montré que la privation de sommeil diminuait la durée de la phase positive et négative des ondes lentes (Carrier et al., 2011 ; Mongrain et al., 2011a). Ainsi, l'effet de la privation de sommeil sur la durée des phases des ondes lentes n'est pas encore bien caractérisé. La réponse à la privation de sommeil sur les caractéristiques spécifiques des ondes lentes chez les souris *Nlgn1*^{-/-} ainsi que la réponse de leur génome à la privation de sommeil demeure inconnu, c'est ce que nous avons étudié dans mon premier article de thèse (en annexe et **section 3.1.2.**, Massart et al., 2014).

1.2.2. La famille des récepteurs Eph et leurs ligands les éphrines

Les récepteurs Eph constituent une des plus grandes familles de récepteurs à tyrosine kinase et ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques tels que le développement embryonnaire, la morphogénèse ou encore la formation des circuits neuronaux. En 1987, Hirai et collaborateurs ont cloné ce qui devint le premier récepteur de la famille, EphA1, à partir d'une lignée de cellules de carcinome « Erythropoietin-Producing Hepatocellular carcinoma cell-derived » (Hirai et al., 1987). Chez les vertébrés, cette famille de récepteurs est composée de 16 gènes (EphA1 à A10 et EphB1 à B6), dont 14 sont exprimés chez les mammifères (Murai and Pasquale, 2003). Jusqu'au milieu des années 90, on parlait de récepteurs « orphelins » car les chercheurs n'avaient pas encore identifiés les ligands. Bergemann et collaborateurs en 1995 identifièrent leurs premiers ligands qu'ils nommèrent Elf pour « Eph Ligand Family » (Bergemann et al., 1995). Plus tard, la nomenclature de ces récepteurs et de leurs ligands est devenue de plus en plus complexe. En 1997, cette nomenclature fut simplifiée (Eph Nomenclature Committee 1997). Les Eph se divisent en deux classes, la classe A allant de A1 à A10, et la classe B allant de B1-B6. Les ligands, Efn, sont nommés « éphrines » pour « EPH Receptor INteracting proteins » et ont été classé tout comme les récepteurs en deux classes, A

et B, et on y dénombre 9 membres (EfnA1 – A6 et EfnB1 – B3, pour revue Himanen and Nikolov, 2003; Pasquale, 2005; Himanen et al., 2007). Les ligands de types A possèdent une ancre de type GPI (Glycosyl Phosphatidylinositol) qui les lie à la membrane, alors que ceux de type B sont constitués d'un domaine transmembranaire et cytoplasmique (Murai and Pasquale, 2003, 2004; pour revue Kullander and Klein, 2002). Globalement, les éphrines-A ont plus d'affinité pour les récepteurs EphA alors que les éphrines-B se lient préférentiellement aux EphB. Il existe des exceptions, comme le récepteur EphA4 qui lie également les éphrines-B2 et -B3 (Gale et al., 1996), et EphB2 qui se lie à éphrine-A5 en plus des éphrines-B (pour revue Himanen et al., 2004; Pasquale, 2005). Bien que les Eph et les éphrines soient déterminantes dans le développement et la guidance axonale lors de l'embryogénèse, elles se retrouvent également dans le SNC adulte. De manière générale, les Eph et les éphrines sont exprimés chez l'adulte sur les membranes pré- et post-synaptiques. Le récepteur EphA4 et l'éphrine-A3 ont également été retrouvés sur les astrocytes (pour revue Klein, 2009).

1.2.2.1. Leur structure

Au niveau de la région N-terminale extracellulaire, le récepteur Eph possède un domaine globulaire qui se fixe au ligand. Du côté intracellulaire, le domaine kinase est précédé d'un domaine juxtamembranaire qui possède une tyrosine qui est phosphorylée lors de la liaison du récepteur avec une éphrine (pour revue Kullander and Klein, 2002; Himanen and Nikolov, 2003). Le récepteur EphA4 a la particularité d'être composé dans cette région d'un motif riche en lysine/arginine qui est le substrat de la γ -sécrétase, une protéase intramembranaire qui a aussi comme substrat la protéine précurseur de l'amyloïde (Haapasalo et al., 2007). La partie C-terminale est composée d'un domaine à motif stérile alpha (SAM pour « Sterile Alpha-Motif ») et d'un motif de liaison aux domaines de type PDZ (Figure 8). Il semblerait que le domaine SAM permette l'agrégation des récepteur en dimères (Qiao and Bowie, 2005) alors que le domaine PDZ interagit avec des protéines souvent associées aux protéines d'échafaudage telles que GRIP (« Glutamate Receptor Interacting Protein ») et PICK (« Protein that Interacts with C Kinase1 ») qui se lient aux récepteurs AMPA (pour revue

Kullander and Klein, 2002). Par ailleurs, l'expression du récepteur EphB2 permet de recruter à la membrane le récepteur AMPA. Cet adressage à la membrane est dépendant de la séquence du domaine PDZ du récepteur EphB2 (Kayser et al., 2006). Enfin, ce même récepteur est capable de se lier directement à la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (pour revue Dalva et al., 2000). Pour les éphrines-A, elles possèdent comme mentionné dans la section précédente, une ancre GPI qui les attache à la membrane alors que les éphrines-B possèdent un domaine transmembranaire avec un motif PDZ à l'extrémité C-terminale (pour revue Murai and Pasquale, 2003, 2004; Xu et al., 2011)

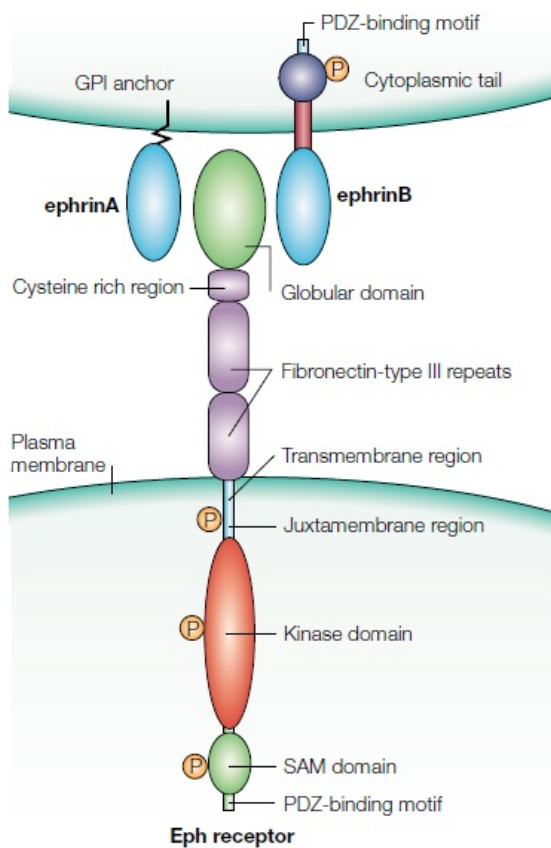


Figure 8 : Représentation schématique de la structure du récepteur Eph et du ligand éphrine. Les récepteurs Eph se lient aux éphrines via un domaine globulaire qui est suivie par une région cystéine et deux régions fibronectine de type III. La région transmembranaire permet la fixation du récepteur à la membrane cellulaire. La partie intracellulaire du récepteur est composée d'une région juxtamembranaire phosphorylable, du domaine kinase du récepteur, d'un domaine SAM et enfin d'un motif de liaison PDZ. Les éphrines-A sont ancrées à la membrane grâce à un groupement GPI, tandis que les éphrines-B possèdent un domaine transmembranaire suivie d'une queue cytoplasmique avec un motif de liaison PDZ (image provenant de Kullander and Klein, 2002).

1.2.2.2. *La signalisation intracellulaire*

La liaison entre le récepteur Eph et leur ligand, éphrine, induit une signalisation bidirectionnelle. C'est-à-dire une signalisation dite antérograde (« forward signaling ») dans la cellule où le récepteur est exprimé, et une signalisation dite inverse (« reverse signaling ») dans la cellule exprimant l'éphrine (Bouvier et al., 2008; pour revue Aoto and Chen, 2007;). Lors de la liaison entre le récepteur et le ligand, des changements considérables ont lieu dans leurs conformations réciproques. En effet, cela va induire le recrutement et l'oligomérisation d'un autre hétérodimère et la formation d'un complexe tétramérique (pour revue Kullander and Klein, 2002).

La signalisation antérograde dépend premièrement de la phosphorylation du domaine tyrosine kinase qui permet au récepteur d'effectuer son autophosphorylation et de phosphoryler par la suite d'autres protéines. Cette phosphorylation est nécessaire pour induire l'activation de protéines effectrices (Bruckner et al., 1999). Ces protéines effectrices sont notamment des protéines de signalisation à domaines SH2 (« Src homology 2 ») dont les Src kinases, la PLC γ (phospholipase-C γ), PI3 kinase (« phosphatidylinositol-3 kinase »), les tyrosine kinases Abl et Arg (« Abl related gene »), les protéines activant les GTPases Ras ou RasGAP (GAP pour « GTPase activating protein ») et bien d'autres (pour revue Kullander and Klein, 2002). Au niveau du domaine PDZ, des protéines de signalisation interagissent avec le récepteur indépendamment de la phosphorylation de celui-ci, il s'agit de protéines appartenant à la famille des facteurs d'échanges du nucléotide guanylique ou GEFs (« Guanine nucleotide Exchange Factors »). Via l'activation de petites GTPases de la famille des Rho (RhoA, Rac1 et cdc42) et des Ras, les récepteurs Eph sont impliqués dans la régulation de la morphologie et du comportement des cellules en modifiant le cytosquelette d'actine et l'adhésion cellulaire (pour revue Murai and Pasquale, 2002). Les GTPases agissent comme des interrupteurs moléculaires, la forme inactive GDP (« Guanosine Di-Phosphate ») est activée en GTP (« Guanosine Tri-Phosphate ») par l'apport d'un groupement phosphate par un membre de la famille des GEF. Cette activation va modifier en aval la polymérisation de l'actine. Lors du guidage axonale, une activation de RhoA entraîne un signal répulsif tel que la rétraction du cône de croissance. A

l'inverse, Rac1 et Cdc42 vont promouvoir l'extension du cône de croissance (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Ethell and Pasquale, 2005).

En ce qui concerne la signalisation inverse, les éphrines-A bien que dépourvues de domaine intracellulaire, sont capables d'activer des membres de la famille des protéines kinases Src et d'activer la signalisation des intégrines (Davy et al., 1999; Davy and Robbins, 2000; Huai and Drescher, 2001). Les éphrines-B quant à elles recrutent des molécules qui phosphorylent leur partie C-terminale et via leur domaine PDZ se lient à des protéines comme la synténine, PICK1 ou les GRIPs (Torres et al., 1998; Hoogenraad et al., 2005).

1.2.2.3. Voies de signalisation d'EphA4

Une des voies de signalisation médiée par l'activation EphA4 implique une protéine particulière, l'éphexine. L'éphexine est un facteur Rho-GEF qui active les GTPases, et qui se lie au récepteur EphA4 (Shamah et al., 2001). Une fois activée, l'éphexine va activer RhoA ce qui entraînerait ainsi un changement dans l'activité GTPasique de RhoA (Sahin et al., 2005) et par conséquent une stimulation de la contraction de l'actine pour aboutir à la rétraction du cône de croissance. Par ce mécanisme, l'activation du récepteur EphA4 permet de contrôler le cytosquelette d'actine. La phosphorylation d'EphA4, induite par sa liaison avec une éphrine, va permettre le recrutement de la PLC γ . La PLC γ hydrolyse PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en IP₃ (inositol 1-4-5-triphosphate) et DAG (diacylglycère) qui induisent une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Cette cascade d'événement modifie l'état de polymérisation de l'actine au niveau de l'épine dendritique (pour revue Matus, 2000). La stimulation du récepteur EphA4 conduirait également à l'inactivation de la GTPase de la famille des Ras, Rap1. Son inactivation inhibe la signalisation des intégrines et diminue l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (Bourgin et al., 2007; Richter et al., 2007). Ainsi, certaines voies de signalisation du récepteur EphA4 activent diverses voies qui interviennent notamment dans la régulation morphologique des épines dendritiques en induisant leur rétraction. De manière intéressante, l'activation du récepteur EphA4 peut agir également sur les processus de transcription de gènes en activant la voie des MAP kinases (« Mitogen-Activated Protein

Kinase », MAPK Shin et al., 2008) connue pour réguler l'expression de 200 à 500 gènes (pour revue Roberts et al., 2000; Bennett et al., 2013; Goldsmith and Bell-Pedersen, 2013).

1.2.2.4. Rôle d'EphA4 dans la plasticité structurale et fonctionnelle

Chez l'adulte, EphA4 est très exprimé dans l'ensemble du SNC notamment dans le cortex, le striatum, le thalamus et l'hippocampe (Greferath et al., 2002; Liebl et al., 2003; Benson et al., 2005) et particulièrement au niveau des synapses (Murai et al., 2003). Il est notamment retrouvé dans les terminaisons axonale et les épines dendritiques de l'hippocampe (Murai et al., 2003; Tremblay et al., 2007; Bouvier et al., 2008) ainsi qu'au niveau des astrocytes (Klein, 2009; Murai and Pasquale, 2011). Comme mentionné dans la section précédente, plusieurs études ont montré qu'EphA4 était impliqué dans la rétraction des épines dendritiques de neurones hippocampiques (Murai et al., 2003; Fu et al., 2007). L'effet de l'activation du récepteur EphA4 sur la plasticité synaptique dépend du type de ligand (éphrine de type A ou éphrine de type B) mais également de la localisation de ce ligand. En effet, de nombreuses études ont montré que l'activation d'EphA4 par son ligand éphrine-A3 situé sur les astrocytes, conduisait à une rétraction des épines dendritiques et une diminution du nombre de synapse, et cet effet est médié par l'activité kinase du récepteur EphA4 (Murai et al., 2003; Bourgin et al., 2007; Fu et al., 2007; Zhou et al., 2007). Ainsi, d'un point de vue de la structure de la synapse, le récepteur EphA4 a un effet opposé à la potentialisation synaptique car son activation peut réduire les épines dendritiques mais son rôle est essentiel dans la maturation et la plasticité cérébrale. De plus, une étude des souris KO pour *EphA4* (*EphA4*^{-/-}) a démontré chez ces souris un défaut dans la maturation des épines dendritiques qui sont plus longues et dont la densité est plus importante que chez les souris sauvages (Murai et al., 2003). Ainsi, le récepteur EphA4 est un acteur clé dans la plasticité structurale des synapses mais il possède également un rôle important dans la plasticité fonctionnelle.

L'interaction entre EphA4 et son ligand éphrine-A3 module également la communication neurone-glie. En effet, EphA4 sur la membrane post-synaptique du neurone interagit avec

épinephrine-A3 situé sur l'astrocyte et cette liaison réduit la recapture du glutamate par les astrocytes. Ainsi, cette communication augmente la quantité de glutamate dans la synapse, ce qui va amplifier l'excitabilité du neurone post-synaptique (Filosa et al., 2009). Par ailleurs, Zhuang et collaborateurs ont montré que la liaison entre épinephrine-B3 et EphA4 situé sur l'astrocyte dans ce cas, stimulerait la libération de D-sérine par l'astrocyte, ce qui influence la force de la synapse (Zhuang et al., 2010). Ainsi, le récepteur EphA4 est également impliqué dans la libération de gliotransmetteurs. De plus l'expression de transporteur de glutamate dans les astrocytes tels que GLT-1 et GLAST, est augmentée dans l'hippocampe de souris *EphA4*^{-/-} (Carmona et al., 2009). Son rôle dans la plasticité fonctionnelle ne se restreint pas au niveau de la communication neurone-glie.

En effet, concernant la plasticité Hebbienne, les souris KO pour *EphA4* présentent des déficits dans la LTP au niveau de neurones matures de l'amygdale (Grunwald et al., 2004; Deininger et al., 2008) mais elles sont également dans l'incapacité de générer une LTP dans l'hippocampe ainsi que de la LTD, qui requière l'interaction d'EphA4 avec son ligand épinephrine-B3 situé au niveau post-synaptique. De plus, l'effet potentialisateur sur l'activité synaptique est, contrairement aux modifications structurelles de la plasticité, indépendamment de l'activité kinase du récepteur EphA4 (Grunwald et al., 2004; Deininger et al., 2008). L'induction de la LTP sur des tranches organotypiques d'hippocampe de souris n'exprimant pas EphA4 spécifiquement dans la région CA1 de l'hippocampe est fortement diminuée en comparaison avec des souris témoins (Filosa et al., 2009). Au niveau de la plasticité non-Hebbienne, une étude sur des neurones corticaux en culture a permis de mettre en évidence qu'une activité synaptique élevée augmente la phosphorylation du récepteur EphA4 qui va en réponse, réguler l'expression de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA à la membrane post-synaptique (Fu et al., 2011). En effet, l'activation du récepteur EphA4 par épinephrine-A1 lui permet d'interagir avec une ubiquitine ligase, APC (« anaphase-promoting complex »). Cette interaction permet l'ubiquitination de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA, ce qui conduit à sa dégradation et à la diminution de l'efficacité synaptique (Fu et al., 2011). De plus, les mêmes auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression d'EphA4 par des shRNA prévient la diminution de l'amplitude

des potentiels post-synaptiques excitateurs induite lors d'une activité synaptique élevée. Une autre voie par laquelle l'activation du récepteur EphA4 pourrait diminuer l'expression du récepteur AMPA serait via Cdk5 (« cyclin-dependent kinase 5 »). En effet, la signalisation induite par la voie EphA4-Cdk5 médie l'internalisation des sous-unités GluR1 et GluR2 du récepteur AMPA (Peng et al., 2013). Ces données suggèrent un rôle pour le récepteur EphA4 dans la diminution du niveau globale d'excitabilité neuronale ou encore appelé « downscaling ».

Le rôle d'EphA4 a également été observé dans les fonctions cognitives et plus précisément dans la mémoire. En 2012, Willi et collaborateurs ont démontré que des souris *EphA4*^{-/-} présentaient des troubles de mémoire dans la reconnaissance de nouveauté spatiale (Willi et al., 2012). Une étude récente a mis en évidence que des souris n'exprimant pas le récepteur EphA4 dans les neurones pyramidaux du cortex présentaient une diminution de la mémoire de peur conditionnée en comparaison à des souris sauvages (Dines et al., 2015). Concernant la mémoire, il a été montré que les peptides amyloïdes β (A β) impliqués dans la maladie d'Alzheimer peuvent activer le récepteur EphA4, ce qui participe à la cytotoxicité des peptides A β sur les neurones. Cette cytotoxicité peut être bloquée à l'aide d'antagoniste pour le récepteur EphA4 (Chen, Y. et al., 2012; Fu et al., 2014; Vargas et al., 2014).

Avec ces observations, nous avons pu voir que le récepteur EphA4 possède un rôle important dans la plasticité synaptique de type Hebbienne et non-Hebbienne, notamment au niveau de paramètres connus comme étant modifiés par les états de vigilance et au sein du SCN. De plus, le récepteur EphA4 est exprimé dans des structures cérébrales importantes pour la régulation du sommeil telles que le cortex et l'hippocampe qui est une région sensible au manque de sommeil. Ainsi, le récepteur EphA4 est un bon candidat pour agir au niveau des processus régulateurs du sommeil.

En conclusion, nous avons pu voir que le récepteur EphA4 était fortement impliqué dans la plasticité synaptique autant au niveau de la structure des épines dendritiques que dans les propriétés fonctionnelles de la synapse en modifiant l'excitabilité des neurones. Alors que Nlgn1 de son côté promeut les interactions entre les cellules, EphA4 semble plutôt avoir un pouvoir

répulsif qui remodèle les épines dendritiques en les rétractant. Il est ainsi intéressant d'étudier ces deux molécules d'adhésion cellulaire qui possèdent des rôles différents dans la physiologie neuronale et donc potentiellement différents en ce qui concerne la régulation du sommeil.

Chapitre 2 : Objectifs

2.1. Objectif et hypothèse générale

Le but premier de mes travaux de recherche était de comprendre l'implication de plusieurs familles de molécules d'adhésion cellulaire dans la régulation du sommeil, et plus particulièrement dans la régulation circadienne et homéostatique du sommeil. Les évidences qui nous ont amené à étudier cette question sont les suivantes : 1- les modifications de l'éveil et du sommeil vont entraîner divers changements au niveau de la communication des neurones et de la plasticité synaptique; 2- les molécules d'adhésion cellulaire sont des membres actifs de la synapse qui modulent la communication neuronale par exemple via la transmission glutamatergique ou encore via des changements de structure (épines dendritiques); 3- les molécules d'adhésion cellulaire étudiées, *Nlgn1* et *EphA4* ont des rôles différents dans la plasticité synaptique. L'hypothèse que nous voulons tester est que l'absence de *Nlgn1* et du récepteur *EphA4* engendre des perturbations spécifiquement dans les marqueurs EEG notamment dans l'activité delta qui est le marqueur principal de l'homéostasie du sommeil, ainsi que dans les marqueurs moléculaires des processus de régulation du sommeil. Les changements observés dans les différents marqueurs des processus impliqués dans la régulation du sommeil définiront le rôle de ces deux molécules dans la régulation du sommeil.

Afin d'apporter les premiers éléments de réponses quant au rôle de ces molécules d'adhésion cellulaire dans la régulation du sommeil, nous avons eu la chance de réaliser des expériences sur deux lignées de souris différentes, une lignée de souris n'exprimant pas *Nlgn1* et une autre n'exprimant pas *EphA4*. Dans ces deux modèles, nous avons enregistré l'activité EEG et caractérisé leurs états de vigilance en condition normale et après une privation de sommeil de 6h effectuée grâce à une manipulation délicate sur les souris. Ainsi, nous avons pu caractériser le rôle de chacune de ces deux molécules d'adhésion cellulaire dans la régulation du sommeil d'une part en analysant les réponses électrophysiologiques et plus précisément, les marqueurs EEG des deux processus et les marqueurs moléculaires de l'homéostasie. De plus,

nous voulions savoir si leur réponse moléculaire après une privation de sommeil était modifiée. Et enfin, nous avons étudiés si la privation de sommeil allait altérer l'expression de ces deux molécules.

2.2. Objectifs et hypothèses spécifiques

2.2.1. Évaluation de l'absence de NLGN1 sur les paramètres des ondes lentes et dans la réponse moléculaire à la privation de sommeil

La première étude dont les résultats sont rapportés dans le premier article, faisait suite aux premières observations faites sur les souris *Nlgn1*^{-/-} (El Helou et al., 2013). En effet, nous avons montré que la durée de l'éveil était diminuée et que l'activité EEG des souris mutantes était altérée. Après privation de sommeil, les souris *Nlgn1*^{-/-} présentaient une augmentation du rebond d'activité delta en comparaison à la réponse des souris sauvages (El Helou et al., 2013). Afin d'approfondir l'étude du rôle de *Nlgn1* dans la régulation du sommeil, nous nous sommes interrogés sur l'effet de l'absence de *Nlgn1* sur les paramètres des ondes lentes chez les souris *Nlgn1*^{-/-}. En effet, comme le rebond d'activité delta est plus important chez les souris *Nlgn1*^{-/-}, et comme souligné dans la **section 1.1.2.6.**, la pente des ondes lentes est augmentée après privation de sommeil et donc son augmentation est corrélée avec une augmentation de l'activité delta, nous avons donc émis l'hypothèse que la pente des ondes lentes serait augmentée chez ces souris. De plus, étant donné les changements mesurés dans l'activité EEG après privation de sommeil chez les souris *Nlgn1*^{-/-}, nous avons émis la seconde hypothèse qui était que les changements électrophysiologiques allaient se traduire au niveau de la réponse transcriptionnelle à la privation de sommeil par une augmentation des gènes qui sont habituellement changés après privation de sommeil. En parallèle, puisque les études par microarray ont montré que l'effet de la privation de sommeil affectait un grand nombre de gène (Maret et al., 2007; Mackiewicz et al., 2008; Mongrain et al., 2010), nous supposons que ces changements d'expression des gènes sont contrôlés, du moins en partie, par des changements épigénétiques tels que la méthylation ou l'hydroxyméthylation, des mécanismes en amont de l'expression des gènes. Dans le contexte du premier article, la troisième hypothèse est donc que

la privation de sommeil induit des changements au niveau de la distribution de la méthylation ou l'hydroxyméthylation, et l'étude de ces marqueurs a été effectuée sur l'ADN de cortex cérébral murin.

2.2.2. Etude du rôle du récepteur EphA4 dans la régulation du sommeil et de l'effet de la quantité d'éveil et du temps du jour sur l'expression d'EphA4 et de ses partenaires d'interaction

La seconde étude présentée dans le deuxième article visait à comprendre le rôle du récepteur EphA4 dans la régulation du sommeil. Le premier objectif était de caractériser le sommeil des souris *EphA4*^{-/-} en condition de base et après privation de sommeil en ayant une attention particulière sur les marqueurs de l'homéostasie du sommeil ainsi que sur les marqueurs circadiens. Etant donné le rôle primordial du récepteur EphA4 dans la plasticité, nous supposons que l'absence d'EphA4 atténuera l'amplitude des changements dans les marqueurs EEG de l'intensité du sommeil observé en fonction de la durée de l'éveil et du sommeil. Aussi, comme le récepteur EphA4 active la voie de MAPK, son absence devrait déréguler la transcription contrôlée par la voie des MAPK. Donc nous nous attendions à ce que la réponse transcriptionnelle à la privation de sommeil chez les souris *EphA4*^{-/-} soit altérée par rapport à celle des souris sauvages, dans le sens où les modifications transcriptionnelles seraient moins importantes chez les souris mutantes afin de répondre à la privation de sommeil.

Afin d'évaluer si l'expression d'*EphA4* ainsi que celle de certains de ses partenaires change en fonction de la quantité d'éveil et en fonction du temps du jour, nous avons quantifié leur expression par PCR quantitative dans différentes régions cérébrales telles que le cortex, l'hippocampe et la région thalamique/hypothalamique. Avec les études réalisées sur le rôle d'EphA4 dans la plasticité non-Hebbienne (voir fin de la **section 1.2.2.4.**) montrant qu'une augmentation de l'activité globale des neurones entraîne une internalisation de sous-unités du récepteur AMPA par le récepteur EphA4, nous nous attendons à ce que la privation de sommeil augmente l'expression d'EphA4 et ce particulièrement dans le cortex car EphA4 y est exprimé et car les marqueurs EEG de l'homéostasie du sommeil sont mesurés dans le cortex. Dans ce sens, l'expression d'EphA4 devrait augmenter au fil de l'éveil et sera diminuée pendant le sommeil.

Enfin dans le deuxième article, nous avons identifié plusieurs « E-Boxes », sur lesquelles se lient les gènes de l'horloge, dans la région promotrice du récepteur EphA4 et d'un de ces ligands principaux, éphrine-B3, ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse que l'expression d'EphA4 serait contrôlée par les éléments de l'horloge biologique et que son expression sera diminuée chez souris mutantes pour le gène de l'horloge *Clock*.

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Article 1

3.1.1. Contribution des coauteurs

J'ai planifié les expériences de privation de sommeil et disséqué les cortex cérébraux des cerveaux de souris grâce auxquels j'ai extrait l'ADN afin d'effectuer les expériences sur les marqueurs épigénétiques étant modifiés avec la privation de sommeil. J'ai procédé aux expériences de PCR quantitative afin de faire les validations pour les résultats obtenus avec le microarray. J'ai participé à la rédaction de l'article et j'ai préparé la majorité des figures (Figure 2, 3, 4 et S1). **Renaud Massart** est le collaborateur principal avec lequel est née cette collaboration. Il a effectué les expériences relatives aux marqueurs épigénétiques (méthylation et hydroxyméthylation), à l'analyse du microarray et à l'analyse IPA (« ingenuity pathway analysis », Figure 2, 3, 4 et S2 et table S1-S10). Il a participé à l'écriture du manuscrit. **Matthew Suderman** a travaillé avec Renaud Massart sur l'analyse du microarray des souris *Nlgn1*^{-/-} ainsi que sur les analyses bioinformatiques des marqueurs épigénétiques. **Jean Paquet** a contribué à l'établissement des critères définissant les ondes lentes ainsi qu'à leur identification et enfin, à l'analyse des caractéristiques des ondes lentes. **Janine El Helou** a effectué l'analyse de l'expression des différents variants de transcription de *Nlgn1* après privation de sommeil et a réalisé la figure supplémentaire S1. **Erika Bélanger-Nelson** a participé aux chirurgies d'implantation des souris *Nlgn1*^{-/-} et à l'organisation des reproductions et de la gestion de la colonie des souris *Nlgn1*^{-/-}. Elle a également extrait l'ARNm des cerveaux de souris mutantes afin de réaliser le microarray. **Adeline Rachalski** et **Ouma-Chandrou Koumar** ont participé à l'identification des états de vigilances des souris *Nlgn1*^{-/-} et aux privations de sommeil. **Julie Carrier** a participé à la mise sur pied du programme de détection des ondes lentes et à la rédaction du manuscrit. **Moshe Szyf** a supervisé les expériences de méthylation et d'hydroxyméthylation et a participé à la rédaction de l'article.

Valérie Mongrain a généré les hypothèses de recherche, a supervisé l'organisation des expériences et a participé à l'écriture du manuscrit. Elle a aussi participé à la gestion des expériences et à l'analyse de ces mêmes données (Figure 1).

3.1.2. Article 1

The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes

Article publié dans «Translational Psychiatry»
en janvier 2014

NB: Voir le site

<http://www.nature.com/tp/journal/v4/n1/supinfo/tp2013120s1.html>

pour les 440 pages des 11 tableaux en figure supplémentaire

The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes

Renaud MASSART^{1‡}, Marlène FREYBURGER^{2,3‡}, Matthew SUDERMAN¹, Jean PAQUET³, Janine EL HELOU³, Erika BÉLANGER-NELSON³, Adeline RACHALSKI³, Ouma-Chandrou KOUMAR³, Julie CARRIER^{3,4}, Moshe SZYF^{1,5,6}, Valérie MONGRAIN^{3,7}

¹Department of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, Montreal, QC, Canada;

²Department of Neurosciences, Université de Montréal, QC, Canada; ³Center for Advanced Research in Sleep Medicine and Research Center, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, QC, Canada; ⁴Department of Psychology, Université de Montréal, QC, Canada; ⁵Sackler Program for Epigenetics and Psychobiology, McGill University; ⁶Fellow of the Canadian Institute for Advanced Research; ⁷Department of Psychiatry, Université de Montréal, QC, Canada.

‡: contributed equally to this work.

Published in : *Translational Psychiatry*

Content: 21 pages, 4 figures, 3 supplementary figures, 11 supplementary tables

Correspondence to be addressed to:

Valerie Mongrain, PhD
Centre for Advanced Research in Sleep Medicine
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

Funding sources: Canadian Institutes of Health Research (Operating Grant 231095-111021 [VM], MOP-42411 [MSzyf]), Fonds de la recherche du Québec - Santé, Research Center of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Sackler McGill Program in Psychobiology and Epigenetics [MSzyf].

ABSTRACT

Sleep is critical for normal brain function and mental health. However, the molecular mechanisms mediating the impact of sleep loss on both cognition and the sleep electroencephalogram remain mostly unknown. Acute sleep loss impacts brain gene expression broadly. These data contributed to current hypotheses regarding the role for sleep in metabolism, synaptic plasticity and neuroprotection. These changes in gene expression likely underlie increased sleep intensity following sleep deprivation (SD). Here, we tested the hypothesis that epigenetic mechanisms coordinate the gene expression response driven by SD. We found that SD altered the cortical genome-wide distribution of two major epigenetic marks: DNA methylation and hydroxymethylation. DNA methylation differences were enriched in gene pathways involved in neuritogenesis and synaptic plasticity, whereas large changes (>4000 sites) in hydroxymethylation were observed in genes linked to cytoskeleton, signaling and neurotransmission, which closely matches SD-dependent changes in the transcriptome. Moreover, this epigenetic remodeling applied to elements previously linked to sleep need (e.g., *Arc*, *Egr1*) and synaptic partners of Neuroligin-1 (e.g., *Dlg4*, *Nrx1*, *Nlgn3*), which we recently identified as a regulator of sleep intensity following SD. We show here that *Neuroligin-1* mutant mice display an enhanced slow wave slope during non-rapid eye movement sleep following SD, but that this mutation does not affect SD-dependent changes in gene expression suggesting that the Neuroligin pathway acts downstream to mechanisms triggering gene expression changes in SD. These data reveal that acute SD reprograms the epigenetic landscape, providing a unique molecular route by which sleep can impact brain function and health.

KEYWORDS: sleep need, cortical synchrony, transcription, DNA methylation and hydroxylation

INTRODUCTION

Sleep associates with brain health, and this relationship is exemplified by the predominance of alterations in sleep macro- and micro-architecture observed in most psychiatric and neurological conditions such as neurodegenerative diseases, autism, schizophrenia or mood disorders.¹⁻⁴ In parallel, sleep perturbations such as sleep fragmentation or sleep loss modulate cognitive performance and mood,^{5,6} and may either alleviate or exacerbate certain psychiatric conditions.⁷ The identification of mechanisms underlying the relationship between sleep and brain function is crucial to develop targeted interventions in several mental health disorders.

Recovery from sleep loss involves a rebound in electroencephalographic (EEG) delta power (1-4 Hz) measured during non-rapid eye movement (NREM) sleep.⁸⁻¹⁰ More recently, the slope of individual NREM sleep slow waves was specifically shown to track sleep need, being steeper after prolonged wakefulness¹¹⁻¹³ indicative of a more synchronized switch between the silent and the burst-firing states of neuronal activity, and likely of increased synaptic efficacy.¹¹ These markers can be used in animal models of impaired central nervous system functioning to dissect the molecular circuitry underlying sleep need.

Important changes in the brain transcriptome are observed with acute sleep deprivation (SD).¹⁴⁻¹⁷ These data contributed to current hypotheses regarding the role for sleep in metabolism and energy regulation, synaptic plasticity and neuroprotection. We showed that the glucocorticoid surge during SD importantly contributes to these changes.¹⁷ However, glucocorticoids do not seem to underlie the EEG response to SD given that adrenalectomy does not acutely change delta power rebound.¹⁷ Therefore, the pathways underlying the changes in brain-expressed transcripts that are specifically linked to EEG recovery features remain to be identified. Targeting pathways regulating gene expression in response to neuronal activity and involved in plasticity, cognition and mental health should help defining the molecular elements underlying the effect of prolonged wakefulness on sleep slow waves.

We recently revealed that Neuroligin-1 knockout mice (*Nlgn1*^{-/-}), which exhibit social novelty and fear-conditioning deficits, show reduced wakefulness duration and altered EEG during wakefulness and sleep.¹⁸ NLGN1 belongs to a family of adhesion proteins involved in shaping

synaptic function, which was linked to autism.¹⁹ Notably, patients with autism spectrum disorder present impairments in sleep initiation and maintenance as well as modifications in EEG activity during both wakefulness and sleep.^{3,20} Thus, NLGN1, and likely its interacting partners, may link neuronal activity to the duration and quality of wakefulness and sleep.¹⁸ Because *Nlgn1*^{-/-} mice show an amplified delta power rebound after SD,¹⁸ these represent a model to delineate the pathways involved in recovery sleep that are associated to differences in cognitive function.

Here, we tested the hypothesis that changes in NLGN1 driven by sleep pressure may play a role in the brain transcriptional response observed after acute SD. We first confirmed the involvement of NLGN1 in shaping the sleep EEG since *Nlgn1*^{-/-} mice specifically showed an enhanced synchrony of neurons under high sleep need, as indexed by higher NREM sleep SW slope. However, SD in *Nlgn1*^{-/-} mice induced changes in gene expression similar to those observed in *Nlgn1*^{+/+} mice, including in the expression of DNA methylation-related enzymes. These results suggest that SD-dependent synaptic modifications that involve NLGN1 are downstream of molecular pathways driving the transcriptional response to sleep loss. We thus explored if epigenetic mechanisms, known to respond to neuronal activity and to regulate the expression of plasticity-related genes,²¹⁻²³ could trigger the SD-dependent changes in synaptic components. We indeed identified differentially methylated and hydroxymethylated regions after SD that were enriched in functional pathways involved in neurotransmission, cellular assembly or metabolism. These results reveal that epigenetic regulation is a unique pathway modulating both the transcriptional and synaptic responses to acute sleep loss.

MATERIAL AND METHODS

For detailed methodological descriptions, see Supplementary information.

Animals and EEG

Male mice from strains C57BL/6J and B6;129-*Nlgn1*^{tm1Bros}/J (*Nlgn1*^{+/+}; *Nlgn1*^{+/-}; *Nlgn1*^{-/-}, exons 1 and 2 replaced by a neo cassette²⁴) were used. Mice used for EEG and microarray are the same

as those used previously,¹⁸ and were implanted for EEG as previously described.¹⁸ EEG was recorded during a 24h baseline, during a 6h SD²⁵ starting at light onset, and during 18h of recovery. Vigilance states were visually assigned to 4-sec epochs.²⁶

Spectral analysis was performed to calculate EEG power during NREM sleep between 0.75 and 20 Hz per 0.25 Hz for the 24h baseline and the first recovery hour. Slow wave (SW) detection was performed during NREM sleep using a home-made detector^{12,13} with criteria adapted from previous work.²⁷ SW properties were averaged per 12h light and dark periods, and for 12 intervals during baseline light, 8 intervals during the 6h following SD, and 6 intervals during dark periods.

Microarray

After EEG, half of *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{-/-} mice were submitted to a second 6h SD immediately followed by sacrifice together with non-sleep deprived mice (Ctrl). Forebrain (hindbrain excised) RNA was extracted,^{17,18} processed and hybridized on Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) by Genome Quebec (Montreal). Data were analyzed using GeneSpring GX (Agilent). P-values were adjusted using Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR).²⁸ qPCR validations were performed as described elsewhere.¹⁸

DNA enrichment and labeling

An anterior part of the cerebral cortex of C57BL/6J mice submitted to a 6h SD was sampled, and DNA was extracted using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). The remaining cerebral cortex was used for RNA extraction to perform qPCR validations (see above). Six pools of DNA (i.e., 3 SD and 3 Ctrl) each including the DNA of 3 SD or 3 Ctrl mice (total 9 mice per condition) were fragmented using a bioruptor (Diagenode) and used for both 5mC and 5hmC enrichments. 5mC enrichment was performed as previously described.²⁹ 5hmC enrichment was performed using the Hydroxymethyl collector kit (ActiveMotif). The DNA input and bound fractions were purified, amplified and labeled using Whole Genome Amplification (Sigma-Aldrich) and CGH Enzymatic Labeling (Agilent Technologies) kits.

5mC- and 5hmC-arrays

Custom 400K promoter tiling arrays were used (Agilent). For 5mC, probe sequences were selected to tile all genomic regions from -1200bp to 2400bp downstream each transcription start site as defined by Ensembl (release 66 for mouse). For 5hmC, all exons including the 250bp before and after each gene were tiled with probes at 100bp spacing (Ensembl release 65 for mouse).

Hybridization, washing, scanning and feature extraction were performed following the Methylated DNA Immunoprecipitation protocols (Agilent). Extracted intensities were analyzed, and lists of differentially 5mC and 5hmC regions was determined as described elsewhere.²⁹ P-values were corrected using FDR (threshold <0.2 for 5mC and <0.1 for 5hmC). qPCR validations were performed as described,²⁹ with *Tbp*, *Gusb*, *Rps9* or *Gapdh* used as reference genes. All data are expressed as group mean \pm SEM.

Biological function analysis

Ingenuity Pathway and DAVID bioinformatics resources^{30,31} were used for biological functions analyses. Significance of enrichments was computed using a Fisher Exact Test.

RESULTS

Altered SW in *Nlgn1*^{-/-} mice

As expected, sleep intensity was increased after SD as indexed by NREM sleep low frequency EEG activity (Fig. 1A). This increase was significantly higher in *Nlgn1*^{-/-} mice than in *Nlgn1*^{+/+} between 0.75 and 1.25 Hz. Low frequency activity reflects individual SW characteristics, which were shown to better define recovery sleep¹¹⁻¹³ with slope, in particular, specifically thought to unmask synaptic efficacy.^{11,32}

Nlgn1^{-/-} mice showed a higher number of SW (i.e., density) during light periods, and higher SW amplitude in the light and dark periods than both *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{+/-} (Fig. 1B). Because these differences were similar in baseline and recovery, they did not depend on the pressure for

sleep. However, only *Nlgn1*^{-/-} and *Nlgn1*^{+/-} mice showed an increase in SW slope after SD during the light period. All genotypes exhibited a decrease in recovery slope compared to baseline in the dark period, with *Nlgn1*^{-/-} showing a steeper slope than other genotypes.

When the time course of SW properties was analyzed in detail (Fig. 1C), *Nlgn1*^{-/-} mice showed higher amplitude and slope compared to *Nlgn1*^{+/+} during the light period, especially under high sleep need during recovery. The increase in SW amplitude and slope between the first interval of baseline and the first interval of recovery was significantly higher in *Nlgn1*^{-/-} than in *Nlgn1*^{+/+} mice ($p < 0.03$). In addition, the decrease in amplitude and slope between the first and last intervals of the recovery light period was higher in *Nlgn1*^{-/-} than in both *Nlgn1*^{+/-} and *Nlgn1*^{+/+} mice (Fig. 1D). SW durations were increased during recovery in all three genotypes.

Typical changes in the brain transcriptome after SD in *Nlgn1*^{-/-} mice

To determine if molecular pathways triggered by SD differed in *Nlgn1*^{-/-} mice, we used microarrays to map changes in the forebrain transcriptome after SD. Combining both genotypes, the expression of 1,298 genes was significantly affected by SD (FDR<0.05), covering biological functions associated with neurological functions, stress response, circadian rhythms, gene expression and psychological disorders (Table S1), with predicted upstream regulators related to metabolism (e.g., UDP-D-glucose), synaptic transmission (e.g., NMDAR), circadian rhythms (e.g., CLOCK) or activity-dependent signaling pathways (e.g., CREB1, CREM) (Table S2). No significant genome-wide Genotype X SD interaction was detected after FDR correction, and only 184 transcripts showed a $p < 0.05$ before correction (Fig. 2A, B).

Therefore, a strong overlap was observed in genes responding to SD in *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{-/-} mice, that did not reflect the amplified rebound of SW slope in *Nlgn1*^{-/-} mice. We validated this conclusion by qPCR performed on selected genes associated to transcription and stress response since all interactions did not reach statistical significance (Fig. 2C), except for *Fgf1* (*Fibroblast growth factor 1*). A significant correlation between qPCR and microarray values was found (Fig. 2D). Interestingly, effects of SD were confirmed for genes associated to transcription (e.g., *Arid4b*, *Cdkn1a*) and to DNA methylation (5mC) (e.g., *Mat2b*, *Dmnt3a1*, *Dnmt3a2*), which suggest a role for these elements in shaping the brain transcriptome in response to SD.

SD changes the epigenome

Thus, the absence of NLGN1 does not importantly contribute to SD-dependent changes in brain transcriptome. However, elevated neuronal activity associated with SD shapes the transcriptome and affects *Nlgn1* expression, which impacts synaptic function. Indeed, in the cerebral cortex specifically, the expression of some *Nlgn1* transcript variants is decreased by SD (Fig. S1A), and our previous data support the involvement of clock genes in this cortical decrease.¹⁸ Epigenetic mechanisms could be responsible for this, because they regulate alternative splicing,³³ and are mechanistically linked to functions affected by SD (e.g., metabolism, stress response), including clock genes.³⁴⁻³⁶ Moreover, the expression of Neuroligins (Nlgn) and their partners Neurexins (Nrxn) was recently shown to be regulated by epigenetic regulators.³⁷

DNA methylation (5mC) is an established mechanism of gene silencing when occurring at upstream transcriptional regulatory regions, while methylation in body of genes could modulate additional regulatory regions or transcriptional processes such as splicing.^{33,38-40} DNA hydroxymethylation (5hmC), a further modification of 5mC, is highly abundant in the brain,⁴¹⁻⁴³ and could serve as a stable mark that diversifies the 5mC signal.^{34,44-46} The impact of SD on genome-wide 5mC and 5hmC profiles was thus examined in the mouse cerebral cortex, for which we first replicated the observation of SD-dependent changes in the expression of genes associated to 5mC (*Dnmt3a1*, *Dnmt3a2*, *Mat2b*; Fig. S1B) as we showed in the forebrain (Fig. 2C). DNA immunoprecipitation and chemical labeling^{42,46} were used, for 5mC and 5hmC, respectively, because of their exquisite specificity for the two different modifications.

SD changes DNA methylation. We observed 227 differentially methylated probes (150 less and 79 more methylated after SD) associated with 136 promoters (FDR<0.2) (Table S3 see <http://www.nature.com/tp/journal/v4/n1/extref/tp2013120x4.pdf>). Enrichments were identified in genes related to neurogenesis ($p=2.91E-5$), synaptic plasticity ($p=5.7E-3$) and glutathione redox reaction ($p=6.9E-3$), with the estrogen receptor ($p=8.09E-3$) as a potential regulator of the differentially methylated genes. For instance, SD changed 5mC of *Wnt5a* and *Dlg4* (*Psd95*), which modulate glutamatergic transmission⁴⁷ or of *Rab11b* and the cadherin *Pcdh19* that associates with synaptic function.^{48,49} Several of these observations were replicated

by qPCR and significantly correlated with array quantification (Fig. 3A, B). Moreover, negative correlations between 5mC and mRNA expression could be detected (e.g., *Aatk*, *Cys1*, *Rab11b*, *Klf15*) (Fig. 3A) as previously reported.⁵⁰ However, the SD-dependent increase in 5mC detected in the second intron of *Dlg4* was associated with an increase in the expression of the short transcript BY124098 (Fig. 3A, C), which is consistent with different roles for DNA methylation in 5' regions and gene body.⁵¹

SD importantly alters DNA hydroxymethylation. Using arrays covering promoters, exons and introns of all known genes, we found 12,637 differentially hydroxymethylated probes (5870 less and 6767 more after SD) associated with 4697 genes (FDR<0.1) (Table S4 see <http://www.nature.com/tp/journal/v4/n1/extref/tp2013120x4.pdf>, Fig. 4A). Interestingly, enrichments were observed for exons and TTS/3'UTR, but negative enrichments for promoters, introns and intergenic regions (Fig. 4B) suggesting that changes in hydroxymethylation target different genomic features than changes in DNA methylation. Gene set analysis showed high enrichments in genes related to organismal death (e.g., *Daxx*, *Tnf*) organization of cytoskeleton (e.g., *Actb*, *Cntn2*, 4), kinase signaling (e.g., *Akt*), neurotransmission (e.g., *Nrxn1-3*, *Nlgn3*) (Table S5 see <http://www.nature.com/tp/journal/v4/n1/extref/tp2013120x4.pdf>, Fig. 4D); with potential regulators including p73 (313 genes), p53 (313 genes) and steroids (glucocorticoid receptors, 132 genes; estradiol, 320 genes) (Table S6 see <http://www.nature.com/tp/journal/v4/n1/extref/tp2013120x4.pdf>). Some of these observations were replicated by qPCR (Fig. 4D, E).

We also compared overlaps between 5hmC differences and publicly available (Encode) H3K4me1 and H3K27ac binding sites that are enriched at enhancers.⁵¹ We detected 1,788 probes at H3K4me1 binding sites corresponding to 912 genes, and 631 probes at H3K27ac binding sites corresponding to 357 genes (Tables S7-8 see <http://www.nature.com/tp/journal/v4/n1/extref/tp2013120x4.pdf>). These overlaps showed enrichments in genes associated with axogenesis (e.g., *Ank3*), neurotransmission (e.g., *Ephb1*) or oxidative stress (e.g., *Gpx1*) (Tables S9-10). Four genes showed a negative correlation between promoter 5hmC and mRNA expression (*Creb3*, Fig. 4E; *Dnajb5*, *Dnmt3a2* and *Mat2b*, Fig. S1B, S3). Other genes, which were differentially hydroxymethylated in their gene body

showed a positive relationship with gene expression (*Egr1*, *Arc*) (Fig. 4E). Interestingly, an increase in 5hmC at the 3' end of *Dnmt3a1* and *a2* after SD (Fig. S3) associated with increased expression of both transcripts (Fig. S1B), as already reported for other genes.⁵² This suggests that changes in 5hmC may affect the expression of enzymes involved in DNA methylation.

DISCUSSION

We here demonstrate that sleep loss has a broad impact on the epigenetic landscape of the cerebral cortex, with DNA methylation and hydroxymethylation modifications highly enriched in genes involved in synaptic regulation, such as members of the *Nrxn-Nlgn* family. We also confirm the requirement of NLGN1 for a normal neuronal synchrony response to SD as reflected by an enhanced slow-wave slope in *Nlgn1*^{-/-} mice. The observation that this EEG response was not coupled to major changes in gene expression supports the hypothesis that NLGN1 acts downstream of the mechanisms triggering transcriptional changes associated with prolonged wakefulness. Our results thus suggest that epigenetic modifications constitute a primary response to elevated sleep pressure showing the potential to integrate different brain processes, and to modulate synaptic function notably by affecting the expression of synaptic elements.

We previously showed that *Nlgn1*^{-/-} mice suffer from impaired wakefulness quality and duration, which associated with enhanced delta power rebound after SD.¹⁸ Here, we observed that *Nlgn1*^{-/-} mice exhibit more SW of higher amplitude and slope, but of equivalent duration. Slow waves may have a role in information processing and synaptic plasticity.^{9,11,27,32} A higher slope associates with more synchronous recruitment of cortical neurons,¹¹ and high amplitude and slope were linked to stronger synaptic strength.^{11,32} However, despite an apparent intensified sleep after SD that may represent stronger synaptic connections, *Nlgn1*^{-/-} mice show deficits in wake duration and quality¹⁸ that suggest either an impaired recovery during sleep or an enhanced damaging impact of wakefulness. The former may be supported by the role of NLGN1 in regulating NMDA receptor activity,⁵³ which may recover during sleep; whereas the second fits with the role of NLGN1 in tuning down glutamate release under high activity.⁵⁴ We

found that SW amplitude and slope decreased in the course of sleep in *Nlgn1*^{-/-} mice, and even more than in *Nlgn1*^{+/+}, suggesting a functional recovery system. Hence, *Nlgn1*^{-/-} mice may express a steeper increase in sleep need during wakefulness likely due to more damaging wakefulness.

The EEG differences between *Nlgn1*^{-/-} and *Nlgn1*^{+/+} mice were observed without major changes in the brain transcriptome after SD. Of note, *Fgf1* was the only transcript showing an increase strictly in *Nlgn1*^{-/-} mice suggesting that this gene is downstream to *Nlgn1*. Administration of FGF1 was shown to increase NREM sleep in mammals,^{55,56} and recent observations of a SD-dependent increase in *Fgf1* in oligodendrocytes may indicate that these cells specifically benefit from such increase during SD.⁵⁷ This indicates that specific cells may be affected in *Nlgn1*^{-/-} mice and that it can impact EEG synchrony in response to SD.

SD increased, in both *Nlgn1*^{-/-} and *Nlgn1*^{+/+} mice, the expression of the DNA methyltransferases *Dnmt3a1* and *Dnmt3a2*. DNMT3a2, in particular, senses calcium-signaling and NMDAR activity.⁵⁸ We also observed a decrease in Methionine adenosyltransferase II beta (*Mat2b*) expression, which is part of a methionine transferase complex that catalyzes the synthesis of the methyl donor in DNA 5mC reactions.⁵⁹ These observations, in addition to the fact that DNA methylation is sensitive to neuronal activity,²² regulates the expression of plasticity-related genes,^{21,23,60,61} and is implicated in cognitive processes and psychiatric diseases,^{21,40,60-62} strongly support the hypothesis that changes in epigenetic mechanisms are responsible for the SD-dependent response of the brain transcriptome.

We indeed discovered that SD changes DNA 5mC and 5hmC patterns in the cerebral cortex. Genes differentially methylated relate to neurogenesis, synaptic plasticity and cellular stress response. Of interest, some of these genes are potential targets of the estrogen receptor, a known modulator of 5mC levels^{63,64} and a proposed regulator of sleep duration.⁶⁵ Furthermore, we observed a widespread impact of SD on the DNA 5hmC landscape, covering genes involved in organization of cytoskeleton, gene expression, neurotransmission, cell signaling and synaptic assembly, which closely reflects functions previously linked to the SD-driven transcriptome.¹⁴⁻¹⁷ We also observed enrichment in genes associated with organismal death that may reflect the cellular stress induced by SD or, alternatively, a stress hardening process as an adaptation to

SD.⁶⁶ Importantly, many transcripts related to synaptic function and adhesion (e.g. *Nrxn1-2-3*, *Nlgn3*, *Ephx3*, *Ephb2-3-4-6*, *Epha7-8*) were enriched in genes differentially hydroxymethylated after SD, providing a pathway by which the 5hmC pattern can feedback on synaptic activity. These include many partners of NLGN1, such as NRXN, NLGN3 and DLG4. Moreover, enriched 5hmC differences in exons and 3'UTR may have a role, as for 5mC,^{33,52} in gene expression, pre-mRNA processing and splicing that is of particular relevance to the *Nrxn-Nlgn* family,⁶⁷ especially in the context of elevated sleep need.¹⁸

Functions covered by epigenetic modifications after SD, and their association with changes in gene expression, strongly suggest that they actively participate in the regulation of sleep need by adjusting the brain transcriptome to the modified internal milieu. In future studies, the direct contribution of both 5mC and 5hmC to the EEG and gene expression changes induced by SD will need to be addressed. Assessing the participation of these changes in the transient and acute response to sleep loss and in more stable events representing chronic adaptation⁶⁸ will reveal basic aspects of brain function and their links to mental health.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to colleagues that helped with SD (S.R. Netedu, H. Blais), and to Gaétan Poirier and Gaétan Tremblay for technical help.

CONFLICT OF INTEREST

None

Supplementary information is available at *Translational Psychiatry's* website

REFERENCES

1. Boland EM, Alloy LB. Sleep disturbance and cognitive deficits in bipolar disorder: toward an integrated examination of disorder maintenance and functional impairment. *Clin Psychol Rev* 2013; **33**(1): 33-44.
2. Krystal AD. Psychiatric disorders and sleep. *Neurol Clin* 2012; **30**(4): 1389-1413.
3. Kotagal S, Broomall E. Sleep in children with autism spectrum disorder. *Pediatr Neurol* 2012; **47**(4): 242-251.
4. Hatfield CF, Herbert J, van Someren EJ, Hodges JR, Hastings MH. Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain* 2004; **127**(Pt 5): 1061-1074.
5. McCoy JG, Strecker RE. The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiol Learn Mem* 2011; **96**(4): 564-582.
6. Walker MP. Cognitive consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Med* 2008; **9** Suppl 1: S29-S34.
7. Dallaspazia S, Benedetti F. Chronobiological therapy for mood disorders. *Expert Rev Neurother* 2011; **11**(7): 961-970.
8. Borbély AA. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1982; **1**(3): 195-204.
9. Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 2006; **10**(1): 49-62.
10. Franken P, Dijk DJ. Circadian clock genes and sleep homeostasis. *Eur J Neurosci* 2009; **29**(9): 1820-1829.
11. Vyazovskiy VV, Olcese U, Lazimy YM, Faraguna U, Esser SK, Williams JC, et al. Cortical firing and sleep homeostasis. *Neuron* 2009; **63**(6): 865-878.
12. Carrier J, Viens I, Poirier G, Robillard R, Lafortune M, Vandewalle G, et al. Sleep slow wave changes during the middle years of life. *Eur J Neurosci* 2011; **33**(4): 758-766.
13. Mongrain V, Carrier J, Paquet J, Bélanger-Nelson E, Dumont M. Morning and evening-type differences in slow waves during NREM sleep reveal both trait and state-dependent phenotypes. *PLoS One* 2011; **6**(8): e22679.

14. Cirelli C, Tononi G. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res* 2000; **885**(2): 303-321.
15. Mackiewicz M, Shockley KR, Romer MA, Galante RJ, Zimmerman JE, Naidoo N, et al. Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics* 2007; **31**(3): 441-457.
16. Maret S, Dorsaz S, Gurcel L, Pradervand S, Petit B, Pfister C, et al. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(50): 20090-20095.
17. Mongrain V, Hernandez SA, Pradervand S, Dorsaz S, Curie T, Hagiwara G, et al. Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep* 2010; **33**(9): 1147-1157.
18. El Helou J, Belanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, et al. Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**(24): 9974-9979.
19. Sudhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 2008; **455**(7215): 903-911.
20. Daoust AM, Limoges E, Bolduc C, Mottron L, Godbout R. EEG spectral analysis of wakefulness and REM sleep in high functioning autistic spectrum disorders. *Clin Neurophysiol* 2004; **115**(6): 1368-1373.
21. Munoz PC, Aspe MA, Contreras LS, Palacios AG. Correlations of recognition memory performance with expression and methylation of brain-derived neurotrophic factor in rats. *Biol Res* 2010; **43**(2): 251-258.
22. Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang MH, Bonaguidi MA, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neurosci* 2011; **14**(10): 1345-1351.
23. Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, et al. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* 2012; **149**(3): 693-707.
24. Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, et al. Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 2006; **51**(6): 741-754.

25. Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbély AA. Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol* 1991; **261**(1 Pt 2): R198-R208.
26. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *Am J Physiol* 1998; **275**(4 Pt 2): R1127-R1137.
27. Mölle M, Yeshenko O, Marshall L, Sara SJ, Born J. Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *J Neurophysiol* 2006; **96**(1): 62-70.
28. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B* 1995; **57**: 289-300.
29. Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Massart R, Ruggiero A, Wang D, et al. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *J Neurosci* 2012; **32**(44): 15626-15642.
30. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**(1): 44-57.
31. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**(1): 1-13.
32. Esser SK, Hill SL, Tononi G. Sleep homeostasis and cortical synchronization: I. Modeling the effects of synaptic strength on sleep slow waves. *Sleep* 2007; **30**(12): 1617-1630.
33. Brown SJ, Stoilov P, Xing Y. Chromatin and epigenetic regulation of pre-mRNA processing. *Hum Mol Genet* 2012; **21**(R1): R90-R96.
34. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 2004; **32**(14): 4100-4108.
35. Donohoe DR, Bultman SJ. Metaboloepigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J Cell Physiol* 2012; **227**(9): 3169-3177.
36. Aguilar-Arnal L, Sassone-Corsi P. The circadian epigenome: how metabolism talks to chromatin remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 2013; **25**(2): 170-176.

37. Runkel F, Rohlmann A, Reissner C, Brand SM, Missler M. Promoter-like sequences regulating transcriptional activity in neurexin and neuroligin genes. *J Neurochem* 2013; doi: 10.1111/jnc.12372.
38. Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med* 2013; **34**(4): 753-764.
39. Szyf M, McGowan P, Meaney MJ. The social environment and the epigenome. *Environ Mol Mutagen* 2008; **49**(1): 46-60.
40. Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem* 2013; **20**(2): 61-74.
41. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 2009; **324**(5929): 929-930.
42. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature Neurosci* 2011; **14**(12): 1607-1616.
43. Jin SG, Wu X, Li AX, Pfeifer GP. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**(12): 5015-5024.
44. Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**(11): 4841-4849.
45. Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, et al. Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell* 2011; **147**(7): 1498-1510.
46. Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Biotechnol* 2011; **29**(1): 68-72.
47. Varela-Nallar L, Parodi J, Farias GG, Inestrosa NC. Wnt-5a is a synaptogenic factor with neuroprotective properties against Abeta toxicity. *Neurodegener Dis* 2012; **10**(1-4):23-26.
48. Khvotchev MV, Ren M, Takamori S, Jahn R, Südhof TC. Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis. *J Neurosci* 2003; **23**(33): 10531-10539.

49. Redies C, Hertel N, Hubner CA. Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res* 2012; **1470**: 130-144.
50. Vardimon L, Kressmann A, Cedar H, Maechler M, Doerfler W. Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(4): 1073-1077.
51. Kulis M, Queirós AC, Beekman R, Martín-Subero JI. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013; S1874-9399(13)00122-3.
52. Day JJ, Childs D, Guzman-Karlsson MC, Kibe M, Moulden J, Song E, et al. DNA methylation regulates associative reward learning. *Nat Neurosci* 2013; doi: 10.1038/nn.3504.
53. Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, et al. Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 2007; **54**(6): 919-931.
54. Peixoto RT, Kunz PA, Kwon H, Mabb AM, Sabatini BL, Philpot BD, et al. Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 2012; **76**(2): 396-409.
55. De Saint Hilaire Z, Nicolaïdis S. Enhancement of slow wave sleep parallel to the satiating effect of acidic fibroblast growth factor in rats. *Brain Res Bull* 1992; **29**(3-4): 525-528.
56. Galan JM, Cuevas B, Dujovny N, Giménez-Gallego G, Cuevas P. Sleep promoting effects of intravenously administered acidic fibroblast growth factor. *Neurol Res* 1996; **18**(6): 567-569.
57. Bellesi M, Pfister-Genskow M, Maret S, Keles S, Tononi G, Cirelli C. Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors. *J Neurosci* 2013; **33**(36): 14288-14300.
58. Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci* 2012; **15**(8): 1111-1113.
59. Igarashi K, Katoh Y. Metabolic Aspects of Epigenome: Coupling of S-Adenosylmethionine Synthesis and Gene Regulation on Chromatin by SAMIT Module. *Subcell Biochem* 2012; **61**: 105-118.
60. Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 89(4): 599-603.

61. Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 2008; 28(42): 10576-10586.
62. van Vliet J, Oates NA, Whitelaw E. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(12): 1531-1538.
63. Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; **452**(7183): 45-50.
64. Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, et al. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 2008; **452**(7183): 112-115.
65. Trenell MI, Marshall NS, Rogers NL. Sleep and metabolic control: waking to a problem? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; **34**(1-2): 1-9.
66. Kultz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 2005; **67**: 225-257.
67. Krueger DD, Tuffy LP, Papadopoulos T, Brose N. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr Opin Neurobiol* 2012; **22**(3): 412-422.
68. Szyf M. The early-life social environment and DNA methylation. *Clin Genet* 2012; **81**(4): 341-9.

FIGURE LEGEND

Figure 1: A) NREM sleep spectral power during the first hour of recovery (REC) after sleep deprivation (SD) expressed relative to the 24h baseline (BL) [n = 9 *Nlgn1*^{+/+}, 13 *Nlgn1*^{+/-}, 12 *Nlgn1*^{-/-}]. Differences between *Nlgn1*^{-/-} and *Nlgn1*^{+/+} are highlighted by red (p≤0.05) and pink (p<0.1) symbols (also in C). **B)** SW density and properties averaged during light or dark periods of BL and REC. SW density was higher in *Nlgn1*^{-/-} than in *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{+/-} for the 12h light (Genotype: $F_{2,24} \geq 3.6$, p<0.04), and was higher in REC than BL for the light period and lower in REC than BL for the dark period (Condition: $F_{1,34} \geq 50.7$, p<0.0001). Amplitude was higher in *Nlgn1*^{-/-} than *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{+/-} for both periods (Genotype: $F_{2,34} \geq 3.8$, p≤0.03); and higher in REC than BL for the 12h light while lower in REC than BL for the 12h dark (Condition: $F_{1,34} \geq 5.3$, p<0.03). Duration of positive phase and of negative phase was higher in REC than BL for both periods (Condition: $F_{2,34} \geq 46.2$, p<0.0001). For the 12h light, slope was higher in REC than in BL only in *Nlgn1*^{-/-} and *Nlgn1*^{+/-} (Interaction: $F_{2,34} \geq 3.2$, p≤0.05). For the 12h dark, slope was lower in REC compared to BL (Condition: $F_{1,34} = 66.5$, p<0.0001) and higher in *Nlgn1*^{-/-} than *Nlgn1*^{+/+} or *Nlgn1*^{+/-} (Genotype: $F_{2,34} = 5.4$, p<0.01). **C)** Time course of SW properties averaged across equal intervals during BL and REC. During light periods, amplitude was higher in *Nlgn1*^{-/-} than *Nlgn1*^{+/+} in the first 6 intervals of REC sleep as was slope for specific intervals (Interactions: $F_{38,589} \geq 2.3$, p<0.03). During dark periods, *Nlgn1*^{-/-} showed higher slope than *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{+/-} (Genotype: $F_{2,31} = 4.6$, p<0.02). All SW properties varied significantly with time, and SD is indicated by the black rectangle. **D)** Decay of SW density, amplitude and slope between the first and the last intervals of REC light. The amplitude and slope decay was higher in *Nlgn1*^{-/-} than *Nlgn1*^{+/+} and *Nlgn1*^{+/-} ($F_{2,31} > 6.6$, p<0.01).

Figure 2: A) Heat maps of the 184 transcripts displaying an interaction Genotype X SD at p<0.05. Columns refer to individual microarray data [n=6 per group]. Transcripts were ordered by hierarchical clustering (complete linkage) with *Nlgn1*^{-/-} fold-change taken as a reference. **B)** Scatter plot of the fold-change in expression induced by SD in *Nlgn1*^{+/+} versus *Nlgn1*^{-/-} mice. Only the 1,298 probes significantly affected by SD with a FDR<0.05 (2-Way ANOVA) are shown. The

184 transcripts that showed an interaction with at $p < 0.05$ before FDR correction are highlighted in red. **C)** Microarray data and qPCR validations of selected targets showing measurements in *Nlgn1*^{+/+} versus *Nlgn1*^{-/-} mice under control and SD conditions. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared to control (and between genotypes for *Arid4b*). **D)** Correlation between fold-change relative to *Nlgn1*^{+/+} in control condition observed in microarray and qPCR validation datasets.

Figure 3: A) Representative examples of changes in 5mC and mRNA expression after a 6h SD in the mouse cerebral cortex. **B)** Correlation between DNA methylation differences measured by 5mC-IP-arrays and validated by 5mC-IP-QPCRs. **C)** Expanded views from the UCSC genome browser at the *Dlg4* gene location. The first track shows average methylation probe fold differences (Log2) and the second shows regions significantly differentially methylated. The last track shows exons and introns taken from the mouse NCBI RNA reference sequence collection (RefSeq). #: $p < 0.1$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared to control.

Figure 4: A) Heat map of 4000 more significant probes showing an effect of SD on 5hmC in the mouse cerebral cortex. Columns refer to 3 pools of DNA of 3 Ctrl and 3 SD mice (total 9 per group). Transcripts were ordered by hierarchical clustering (complete linkage). **B)** Differentially 5hmC sites were enriched in exons ($p < 10E-300$, Fisher Exact Test); TTS/3'UTR ($p < 10E-300$) but negatively enriched in promoters ($p < 10E-300$), introns ($p < 6.8E-11$) and intergenic regions ($p < 1.6E-43$). **C)** Correlation between DNA hydroxymethylation differences measured by 5hmC-IP-arrays and 5hmC-IP-QPCRs for 15 different genomic regions. **D)** Changes in 5hmC after a 6h SD for selected targets. **E)** Selected changes in 5hmC and mRNA expression after a 6h SD. #: $p < 0.1$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared to control.

Figure 1:

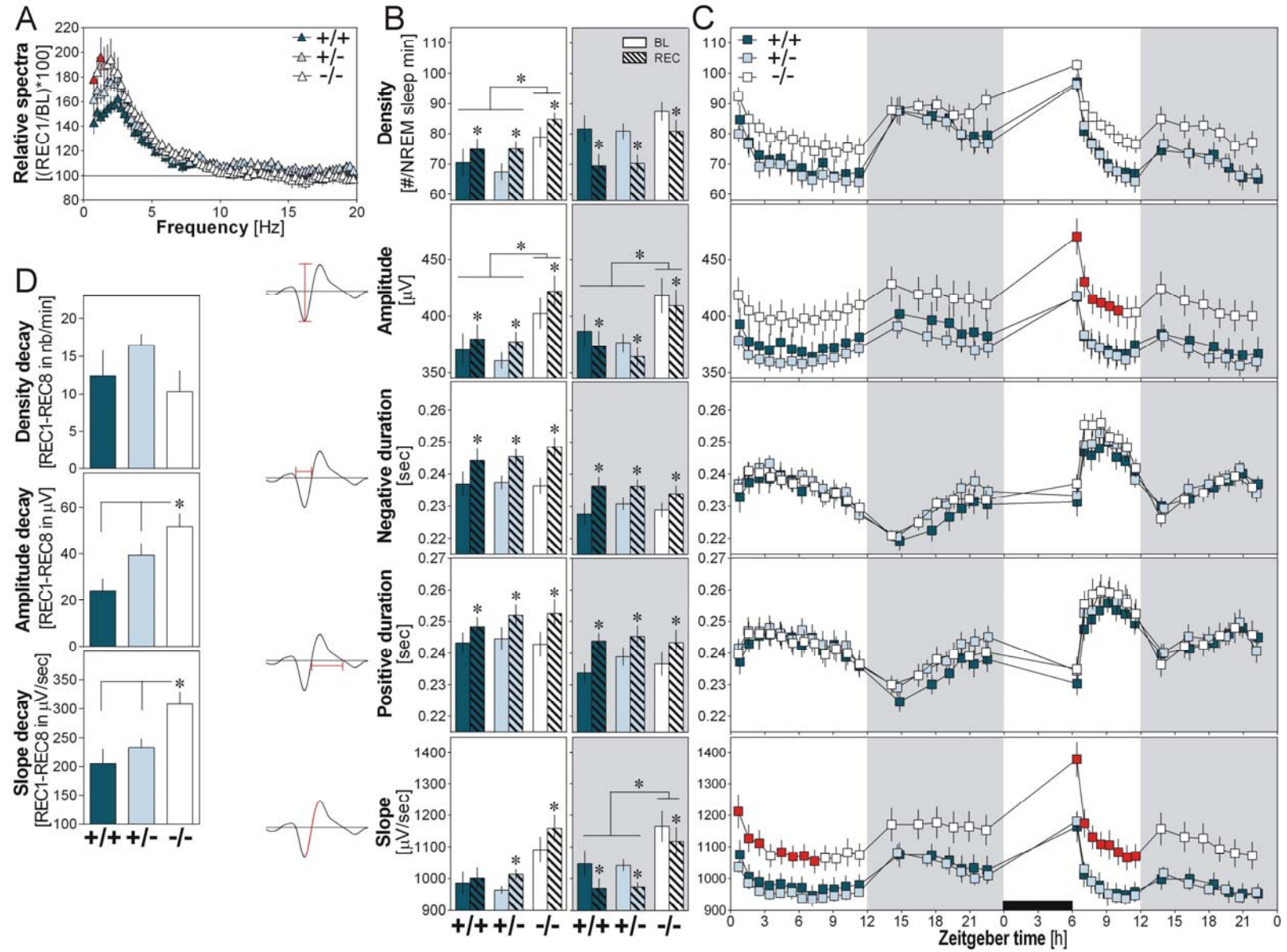


Figure 2:

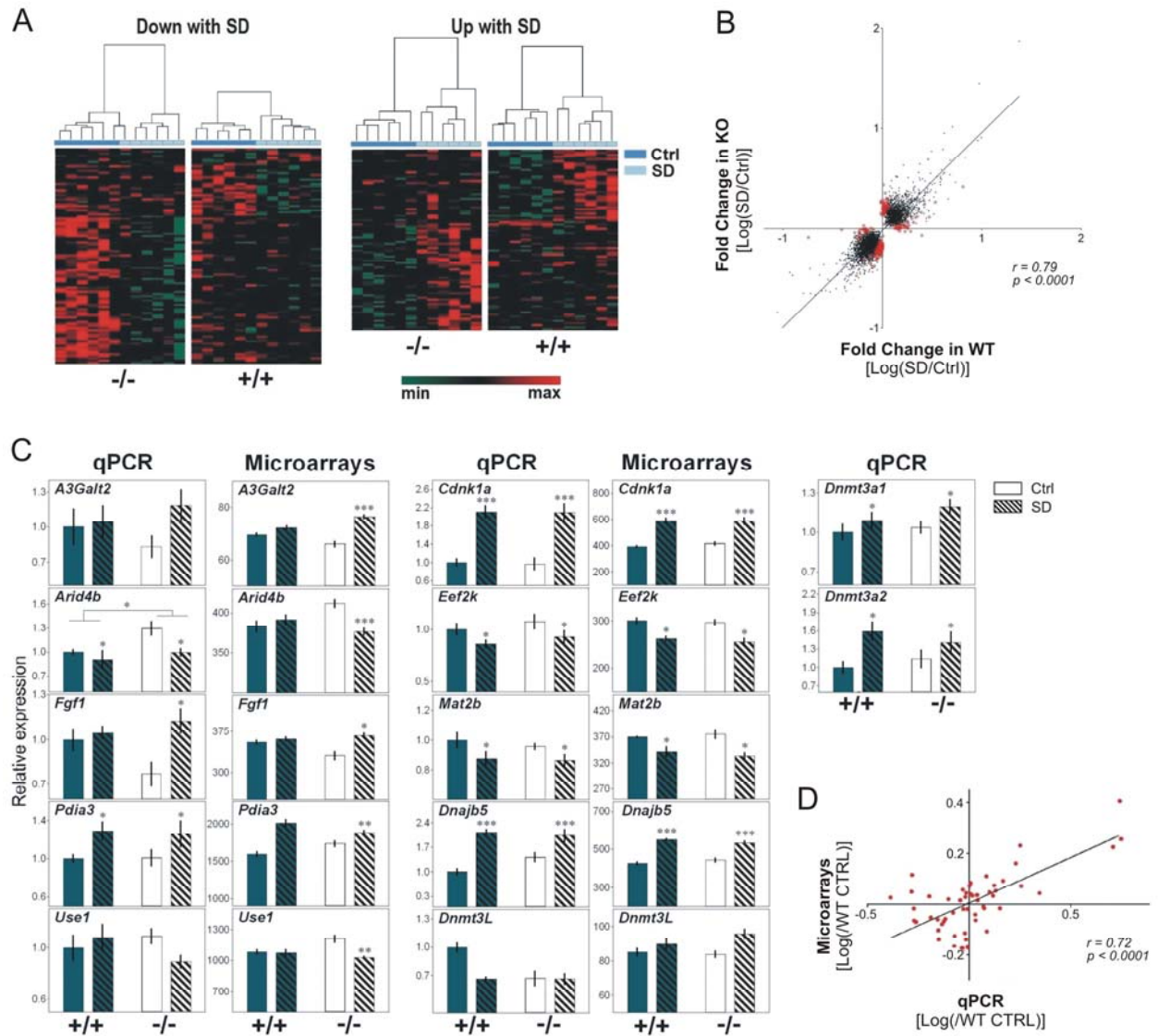


Figure 3:

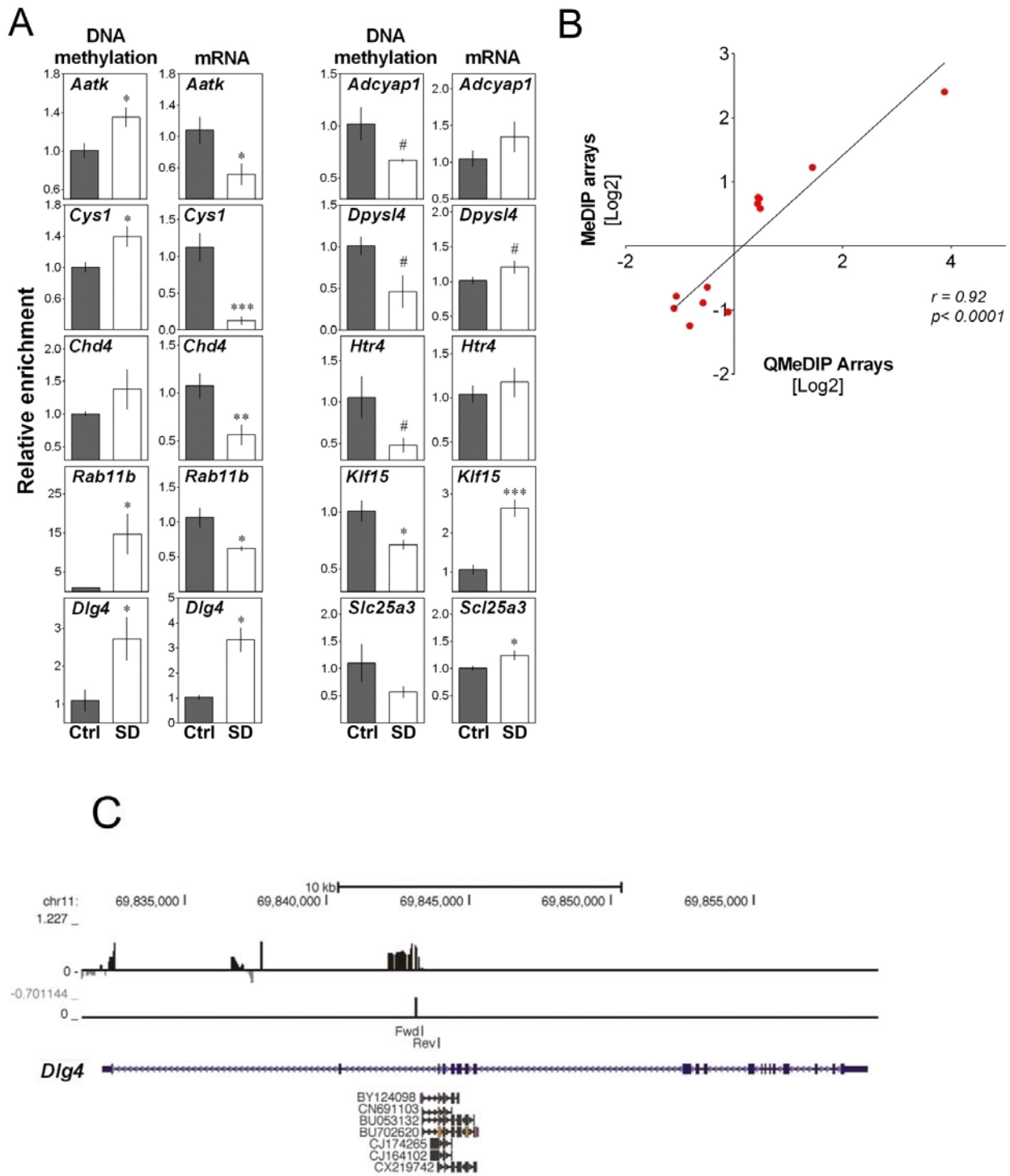
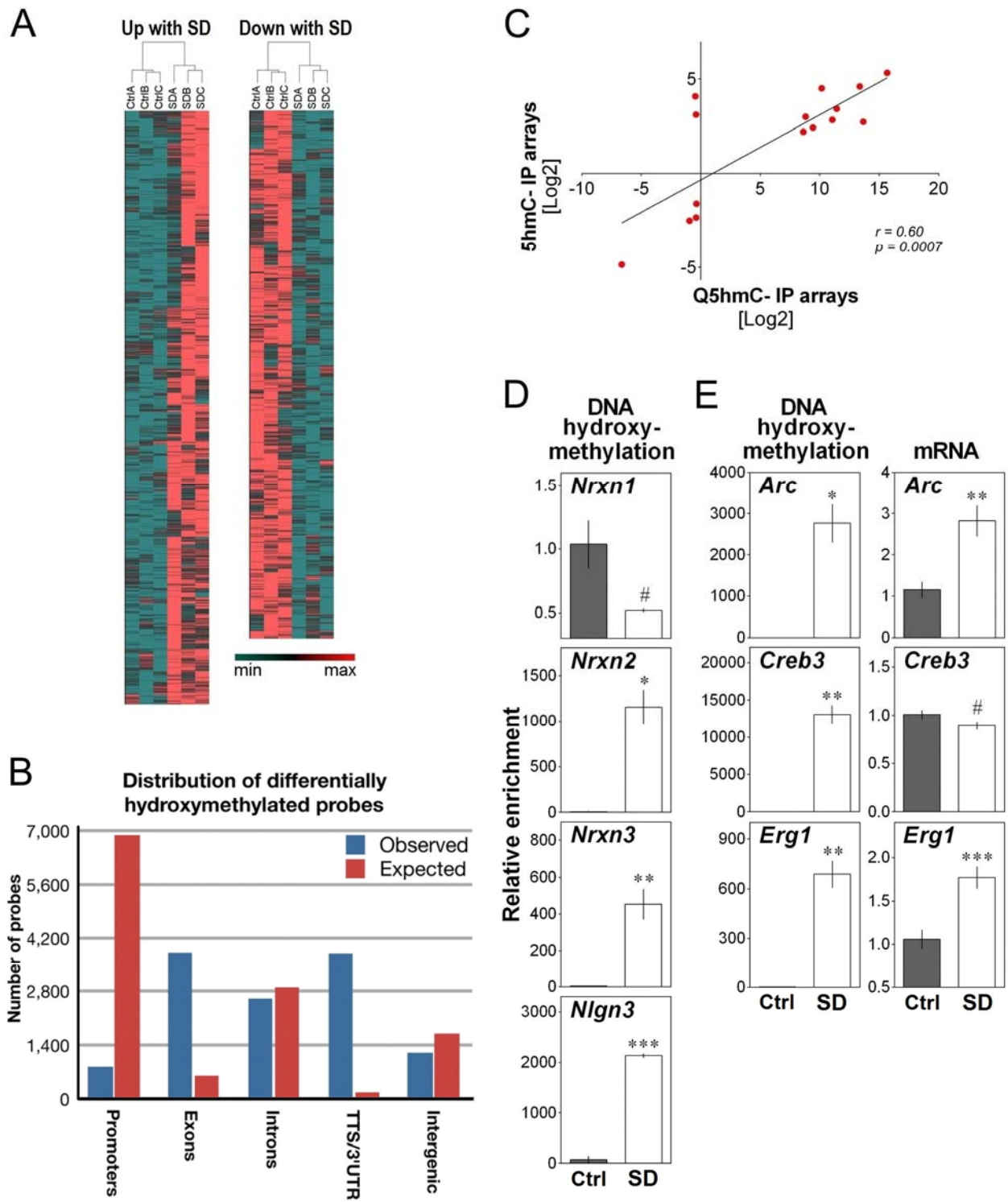


Figure 4:



SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes

Renaud MASSART, Marlène FREYBURGER, Matthew SUDERMAN, Jean PAQUET, Janine EL HELOU, Erika BÉLANGER-NELSON, Adeline RACHALSKI, Ouma-Chandrou KOUMAR, Julie CARRIER, Moshe SZYF, Valérie MONGRAIN

Supplementary information

Protocol

Mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and studied directly (5mC, 5hmC) or after being bred on site (EEG, microarray). Mice were maintained under standard housing conditions (free access to food and water, 12h-light/12h-dark cycle, 22-25°C ambient temperature) for 2 weeks, and then studied in the same conditions between 8 and 16 weeks of age. All experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal.

EEG/EMG electrode implantation surgery and recording

Mice were implanted for electroencephalography (EEG) and electromyography (EMG) as detailed previously.¹ Briefly, when mice reached 9-10 weeks, surgery was performed under deep Ketamine/Xylazine anesthesia (120/10 mg/kg, intraperitoneal injection). Two gold-plated screws (diameter 1.1mm) were screwed through the skull over the right cerebral hemisphere (anterior: 1.7 mm lateral to midline, 1.5 mm anterior to bregma; posterior: 1.7 mm lateral to midline, 1.0 mm anterior to lambda) to serve as EEG electrodes. A third screw placed 6 mm lateral to midline and 3 mm posterior to bregma served as a reference. Three anchors screws

were implanted over the left hemisphere. Two gold wires served as EMG electrodes and were inserted between neck muscles. EEG and EMG electrodes were soldered to a connector and cemented to the skull with the anchor screws. Mice were connected to a swivel contact four days after surgeries, and were habituated for a week before recording. EEG/EMG were amplified (Lamont amplifiers), sampled at 256 Hz and filtered using the software Harmonie (Natus, San Carlos, CA).

EEG spectral analysis, Detection of slow waves and statistical analyses

Spectral analysis was performed using fast Fourier transform on the bipolar EEG signal of artifact-free NREM sleep epochs. SW detection was performed on the bipolar EEG signal of artifact-free NREM sleep epochs. EEG data were initially band pass filtered between 0.5 and 4.0 Hz using a linear phase FIR filter (-3 dB), and the following criteria were used to detect SW: negative-to-positive peak-to-peak amplitude $>120 \mu\text{V}$; negative peak amplitude $>40 \mu\text{V}$; negative phase duration between 0.1-1.0 sec, and positive phase duration <1 sec.

The density of SW was calculated (number per minute of NREM sleep) and for each SW these characteristics were derived: peak-to-peak amplitude (difference in voltage between negative and positive peaks of unfiltered signal in μV), slope (velocity of the change between the negative and positive peaks in $\mu\text{V}/\text{sec}$), duration of the negative phase and duration of the positive phase (in sec). Density and characteristics of SW were averaged per 12h light and dark periods during both baseline and recovery. SW properties were also separately averaged for 12 intervals during the light period, for which an equal number of epochs contributed, for 8 intervals during the 6h immediately following SD, and for 6 intervals during the dark periods.

One-way analyses of variance (ANOVAs) were used to compare, between genotypes, the power spectra and two-way ANOVAs were used for properties SW per 12h period (Genotype x Day). Time course of SW properties were compared separately for the light and dark periods using two-way repeated-measure ANOVAs with factors Genotype (Nlgn1+/+ vs. Nlgn+/- vs. Nlgn-/-) and Interval. Significant effects were decomposed using planned comparisons and significance levels for repeated measures were adjusted using Huynh-Feldt correction. Statistical analyses

were performed using Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Significance threshold was set to 0.05 and data are reported as mean \pm SEM.

cDNA Microarray and Quantitative PCR

After EEG recordings, half of Nlgn^{-/-} mice and their Nlgn1^{+/+} littermates were submitted to a second 6h SD and were sacrificed at ZT6 together with non-sleep deprived mice (Ctrl). Brains were immediately extracted and frozen on dry ice or liquid nitrogen. RNA extraction and reverse transcription were performed as detailed before.^{1,2} Briefly, RNA was extracted from the forebrain (excision of the brainstem and cerebellum)² using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit and was Dnase-treated (QIAGEN). Total RNA was quantified using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) and its integrity was assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Sense-strand cDNA was synthesized from 250ng of total RNA using the Ambion[®] WT Expression Kit according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Burlington, ON). The cDNA was fragmented and labeled with the Affymetrix GeneChip[®] WT Terminal Labeling Kit according to manufacturer's instructions (Affymetrix). The fragmented and labeled DNA target was hybridized on Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) and incubated at 450C in a Genechip[®] Hybridization oven 640 (Affymetrix) for 17h at 60 rpm. Arrays were then washed in a GeneChips[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix) using Affymetrix Hybridization Wash and Stain kit according to the manufacturer's instructions (Affymetrix). The microarrays were finally scanned on a GeneChip[®] scanner 3000 (Affymetrix). Sense-strand cDNA synthesis, fragmentation, labeling, hybridization and microarray scanning were performed by Genome Quebec (Montreal).

Microarrays were analyzed using the GeneSpring GX software (Agilent). In brief, probe intensities were normalized to each other using RMA.³ Expression differences associated with SD and interaction between Genotype and SD were then obtained using two-way ANOVA with type-III sum of square. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) method.⁴ A gene was then called differentially expressed after SD if its FDR was lower than 0.05.

For qPCR, 0.5 µg of RNA was used for reverse transcription using random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Basel), according to standard procedures. Quantitative PCR was performed using a ViiA7 real-time cycler (Life Technologies). Individual mouse cDNA was diluted and used in 10 µL reaction with Fast TaqMan Master Mix reagent (Life Technologies) under these cycling conditions 95°C for 20 sec, followed by 40 cycles of 95°C for 1 sec, and 60°C for 20 sec. Assays were designed at an exon-exon junction using Primer Express (Applied Biosystems). Primers were purchased from Invitrogen, Life Technologies, or Operon (Huntsville, AL), and probes from Eurogentec (Seraing, Belgium) or Operon. Sequences of designed oligos or Taqman Gene Expression Assay numbers are provided in Table S11. The most stable endogenous controls were selected among Actin, Tbp, GusB and Rps9 using Expression Suite v1.0 (Life Technologies), and 2 or 3 controls were used to perform relative quantification using a modified $\Delta\Delta C_t$ method (Expression Suite v1.0).

DNA enrichment and labeling

For 5mC and 5hmC assays, B6 mice were submitted to a 6h SD from ZT0 to ZT6 immediately followed by sampling and freezing of an anterior part of the cerebral cortex. DNA was extracted using a DNeasy Blood & Tissue Kit with RNase treatment (Qiagen). DNA amount and quality were verified with a NanoDrop ND-2000 (Thermo). For both 5mC and 5hmC enrichments, the same six DNA pools were used (3 SD and 3 Ctrl). Each DNA pool consists in 3 mice of the same condition (SD or Ctrl; total n = 9 mice per condition). To ensure that DNA was pooled equally, DNA concentrations were measured using a fluorometer (Qubit, Invitrogen). Each pool, consisting in 2.1 µg of DNA (700 ng per mouse), was fragmented using a bioruptor (Diagenode), and 100 ng of DNA per pool was used to confirm the range of DNA size after sonication (150-500 pb).

The MeDIP analysis was adapted from a previous publication⁵ as described previously.⁶ Briefly, 2µg of sonicated DNA was immunoprecipitated using 10µg of anti-5-methyl-cytosine (Eurogentec, Köln, Germany). The DNA-antibody complex was immunoprecipitated with 5 mg of protein G, and the methylated DNA was resuspended in 250 µl of digestion buffer (50 mM TRIS-HCl, pH8; 10 mM EDTA, 0.5% SDS) and treated with 40 mg of proteinase K overnight at 55°C.

5hmC enrichment was performed using the Hydroxymethyl collector kit (ActiveMotif) and 2 μ g of fragmented DNA. The DNA was incubated in the presence of a β -glucosyltransferase enzyme and a modified UDP-glucose donor to create glucosyl-hydroxymethylcytosines. A biotin conjugate was then chemically attached to the modified glucose. Magnetic streptavidin beads were used to precipitate the biotinylated 5hmC DNA fragments.

The input and bound fractions for 5mC and 5hmC enrichment analyses were purified and amplified using the Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany). The amplified input and bound fractions were labeled for hybridization with either Cy3-dUTP or Cy5-dUTP, respectively, using the CGH Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

5mC and 5hmC microarray design, hybridization, scanning and analysis

All the steps of hybridization, washing, scanning and feature extraction were performed following the Agilent protocols for Methylated DNA Immunoprecipitation. After microarray scanning, probe intensities were extracted from scan images using Agilent's Feature 10.⁵ Image Analysis Software. The extracted intensities were then analyzed using the R software environment for statistical computing as described elsewhere.⁶ Log-ratios of the bound (Cy5) and input (Cy3) microarray channel intensities were computed for each microarray and then microarrays were normalized to one another using quantile-normalization⁷ under the assumption that all samples have identical overall 5mC or 5hmC levels.

The list of differentially 5mC and 5hmC regions between groups of samples was determined in two stages to ensure both statistical significance and biological relevance. In the first stage, linear models implemented in the 'limma' package⁸ of Bioconductor⁹ were used to compute a modified t-statistic between the two groups from the normalized intensities of the probes across all samples. An individual probe was called differentially 5mC if the significance of its t-statistic was at most 0.05 (uncorrected for multiple testing) and the associated difference of means between the groups was at least 0.5. For each gene promoter on the promoter tiling microarray (5mC), we calculated the significance of enrichment for high or low probe t-statistics of all probes within the promoter. For the exon-tiling microarray (5hmC), we partitioned tiled

regions into 1000bp and calculated the significance of enrichment for high and low probe t-statistics of all probes within the region. Significance was determined using the Wilcoxon rank-sum test comparing t-statistics of these probes against those of all the probes on the microarray. The resulting p-values for each promoter or 100bp region were then corrected for multiple testing by calculating their FDR. A gene promoter or region was then called differentially methylated or hydroxymethylated if its FDR was at most 0.2 (5mC) or 0.1 (5hmC) and one of its probes was called differentially methylated or hydroxymethylated.

5mC- and 5hmC-arrays validations and cDNA quantification

Gene-specific qPCR validations were performed on the amplified and input bound fractions as described in previously.⁶ Relative enrichment was determined after normalizing from the input fraction in each sample. For cDNA qPCR on RNA extracted from the cerebral cortex, Tbp, GusB, Rps9 or Gapdh were used as reference genes. SYBR green qPCR was performed using the LightCycler® 480 system (Software 3.5, Roche Molecular Biochemicals). To determine relative concentration of mRNA expression or relative 5mC/5hmC enrichments, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used. Sequences of designed oligos are provided in Table S11. All data are expressed as group mean \pm SEM. Student's unpaired one-tailed t-tests were used with an alpha level set to 0.05. Welch's correction was applied when the 2 groups had unequal variances. Graphpad 5 software (La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analysis.

Biological function analysis

For biological functions analyses, selected genes were overlaid on the global molecular network developed from information contained in the Ingenuity Pathway knowledge base (www.ingenuity.com). This network is composed of >3.5 million literature-based biological links between genes and bioactive molecules. Sub-networks are built on genes of interest based on their connectivity within this global network taking into account the relative numbers of network eligible molecules, of molecules analyzed and the total number of molecules in Ingenuity's knowledge base. The top biological functions associated with each network are determined by querying the Ingenuity Pathways Knowledge Base for relationships between the

genes in the network and the cellular and organismal functions they impact. The significance of the association between the network and those biological functions is scored using a right-tailed Fisher Exact Test. Lists of selected genes were also analyzed using DAVID bioinformatics resources^{10,11} that allow to map genes to associated biological annotation (e.g., gene ontology terms), and then to statistically compute the most enriched biological annotations using Fisher's Exact Test. DAVID also allows functional annotation clustering of co-occurrences found in multiple annotation content to highlight important annotation groups by calculating enrichment scores using Kappa statistics.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. El Helou J, Belanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, et al. Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(24): 9974-9979.
2. Mongrain V, Hernandez SA, Pradervand S, Dorsaz S, Curie T, Hagiwara G, et al. Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep* 2010; 33(9): 1147-1157.
3. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(4): e15.
4. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B* 1995; 57: 289-300.
5. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet* 2006; 38(2): 149-153.
6. Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Massart R, Ruggiero A, Wang D, et al. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *J Neurosci* 2012; 32(44): 15626-15642.
7. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003; 19(2): 185-93.

8. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; 21(9): 2067-75.
9. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5(10): R80.
10. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4(1): 44-57.
11. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(1): 1-13.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND

Figure S1: A) Relative expression of Nlg1 transcript variants in the cerebral cortex of C57BL/6J mice at ZT6 (6 h after light onset) under undisturbed (sleep) condition (i.e., Control) or after a 6h sleep deprivation (SD) (n=5-6/condition). SD significantly decreased the expression of Nlg1 with insert A, with insert B and common Nlg1 (t=3.5, **p<0.01; t=4.2, **p<0.01 and t=3.8, ***p<0.001, respectively). B) Relative mRNA expression of Dnajb5, Dnmt3a1, Dnmt3a2 and Mat2b in cerebral cortex of C57BL/6J mice at ZT6 under control condition or after a 6h SD (n=9 for each group). SD significantly increased the expression of Dnajb5, Dnmt3a1 and Dnmt3a2 (t<-2.5, *p<0.05, ***p<0.001) but decreased significantly the expression of Mat2b (t=3.2, **p<0.01).

Figure S2: Most significant canonical pathway associated with the 5hmC differences induced by SD: Axonal guidance. Genes associated with an increase and a decrease in 5hmC are colored in red and blue respectively.

Figure S3: Expanded views from the UCSC genome browser at the Dnmt3a gene location. The first track shows average methylation (5mC) probe fold differences (Log2) and the second shows regions significantly differentially methylated. The third track shows average

hydroxymethylation (5hmC) probe fold differences (\log_2) and the fourth track shows regions significantly differentially hydroxymethylated. The last track shows exons and introns taken from the mouse NCBI RNA reference sequence collection (RefSeq).

Figure S1:

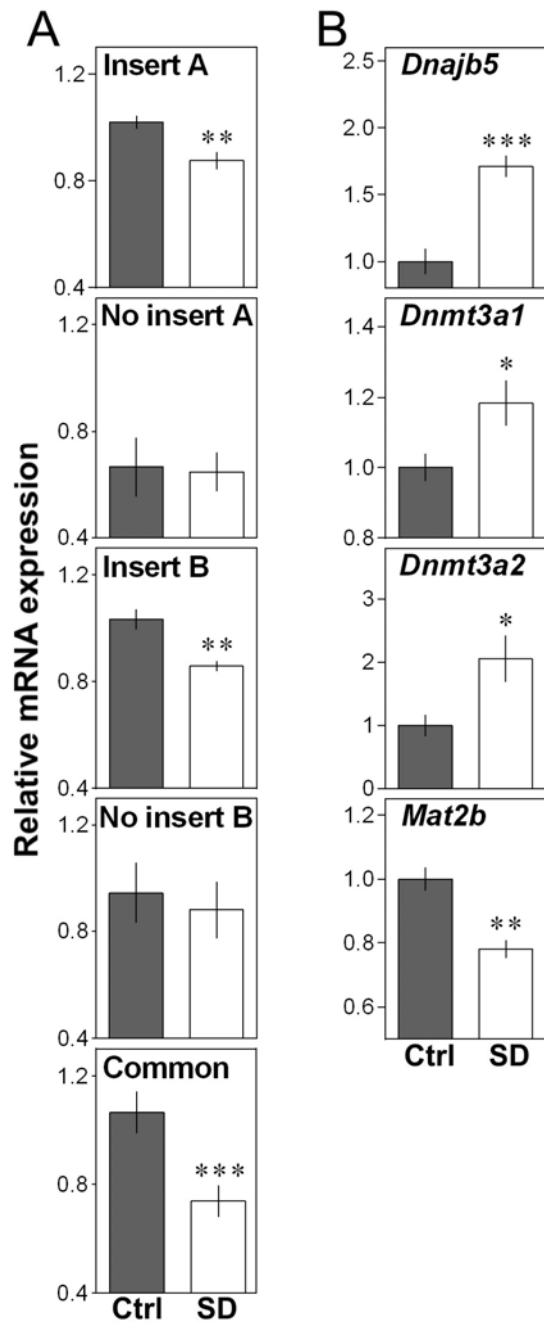
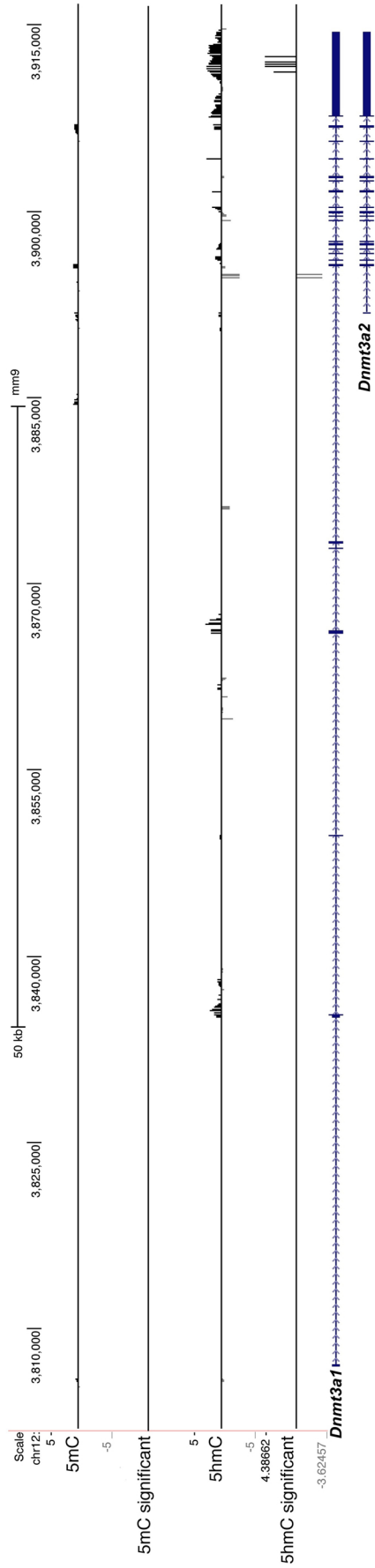


Figure S3:



3.2. Deuxième article

3.2.1. Contribution des coauteurs

J'ai pris en charge la gestion de la colonie des souris *EphA4*^{-/-} et j'ai procédé au génotypage des souris puis effectué toutes les chirurgies d'implantation EEG/EMG. J'ai participé à l'analyse de l'activité EMG. J'ai extrait les ARNm des prosencéphales des souris *EphA4*^{-/-} et du cortex, de l'hippocampe et de la région thalamique/hypothalamique des souris C57BL/6J grâce auxquels j'ai pu réaliser les expériences de qPCR. J'ai également contribué à la recherche des « E-boxes » dans les régions promotrices d'*EphA4* et d'éphrine-B3. J'ai participé à la construction de l'ensemble des figures et à l'écriture du manuscrit. **Audrey Pierre** et **Gabrielle Paquette** ont participé à l'identification des états de vigilance des souris. **Audrey Pierre** a également procédé à l'analyse des états de vigilance, à l'analyse spectrale de l'EEG et elle a construit les premières ébauches des figures suivantes : Figure 1A, B, C, D, et la Figure 2. **Erika Bélanger-Nelson** a commencé la gestion de la colonie de souris *EphA4*^{-/-} et a effectué l'extraction des ARNm de cerveau de souris *Clock* mutantes ainsi que la qPCR. **Pierre-Oliver Gaudreault** a procédé aux expériences comportementales des souris afin d'évaluer leurs déficits neurologiques. **Guy Drolet** et **Sylvie Laforest** ont mis au point et effectué les hybridations *in situ* d'*EphA4*. **Nicolas Cermakian** a donné les tissus des souris *Clock* mutantes et a contribué à la rédaction de l'article. **Guy Doucet** a suggéré l'idée de travailler sur les souris *EphA4*^{-/-}, il a contribué au montage de la figure 6D et à l'écriture de l'article. **Valérie Mongrain** a généré les hypothèses de recherche, a supervisé l'organisation des expériences et a participé à l'écriture du manuscrit. Elle a aussi participé à la gestion des expériences et à l'analyse des données.

3.2.2. Article 2

EphA4 is involved in sleep regulation but not in the electrophysiological response to sleep deprivation

Article accepté par la revue « Sleep »

le 15 octobre 2015

EphA4 is involved in sleep regulation but not in the electrophysiological response to sleep deprivation

Marlène Freyburger, MSc^{1,2}; Audrey Pierre¹; Gabrielle Paquette, BSc¹; Erika Bélanger-Nelson, MSc¹; Joseph Bedont, BSc³; Pierre-Olivier Gaudreault, BSc^{1,4}; Guy Drolet, PhD⁵; Sylvie Laforest, BSc⁵; Seth Blackshaw, PhD³; Nicolas Cermakian, PhD⁶; Guy Doucet, PhD²; Valérie Mongrain, PhD^{1,2}

¹Center for Advanced Research in Sleep Medicine and Research Center, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montreal, QC, Canada; ²Department of Neuroscience, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada; ³Department of Neuroscience, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA; ⁴Department of Psychology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada; ⁵Centre de Recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada; ⁶Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada;

Submitted for publication in: Sleep

Abbreviated title: EphA4 regulates sleep

Content: 23 pages, 7 figures, 249 words in abstract, 663 in introduction, and 1599 in discussion

Correspondence should be addressed to:

Valerie Mongrain, PhD
Centre for Advanced Research in Sleep Medicine
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

Disclosure statement: Research conducted thanks to a J.A. De Sève fellowship (MF), a Université de Montréal COPSE fellowship (GP), a Université de Montréal graduate studies fellowship (MF), NSERC discovery grants (NC, VM), an NSF predoctoral award (JB) and FRQS salary awards (VM, NC). The content is solely the responsibility of the authors and does not represent the official views of the above funding agencies. The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

Study Objectives: Optimal sleep is ensured by the interaction of circadian and homeostatic processes. Although synaptic plasticity seems to contribute to both processes, the specific players involved are not well understood. The EphA4 tyrosine kinase receptor is a cell adhesion protein regulating synaptic plasticity. We investigated the role of EphA4 in sleep regulation using electrocorticography in mice lacking EphA4 and gene expression measurements.

Design: 12 h light: 12 h dark cycle, 48 h electrophysiological recordings or brain sampling at different time-of-day.

Setting: Rodent electrophysiology and molecular laboratories.

Animals: *EphA4* knockout (KO) mice, *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice and littermates, C57BL/6J and CD-1 mice, and Sprague-Dawley rats.

Interventions: Undisturbed conditions or 6 h sleep deprivation (SD).

Measurements and Results: *EphA4* KO mice showed less rapid-eye-movement sleep (REMS), enhanced duration of individual bouts of wakefulness and non-rapid eye movement sleep (NREMS) during the light period, and a blunted daily rhythm of NREMS sigma activity. The NREMS delta activity response to SD was unchanged in *EphA4* KO mice. However, SD increased *EphA4* expression in the thalamic/hypothalamic region in C57BL/6J mice. We further show the presence of E-boxes in the promoter region of *EphA4*, a lower expression of *EphA4* in *Clock* mutant mice, a rhythmic expression of EphA4 ligands in several brain areas, expression of *EphA4* in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN), and finally an unchanged number of cells expressing *Vip*, *Grp* and *Avp* in the SCN of *EphA4* KO mice.

Conclusions: Our results suggest that EphA4 is involved in circadian sleep regulation.

Keywords: rapid eye movement sleep, delta activity, sigma activity, gene expression, suprachiasmatic nuclei.

INTRODUCTION

Sleep is required for brain functioning and the maintenance of cognitive abilities,^{1,2} and alterations in sleep are observed in psychiatric and neurological conditions such as bipolar disorders and neurodegenerative diseases.^{2,3} Understanding cellular and molecular mechanisms of sleep regulation and their relationship to brain health is essential to define new therapeutic targets to alleviate sleep disturbances and cognitive impairments.

Sleep is tightly regulated by two main processes, a circadian and a homeostatic process, the interaction of which determines the quality of both wakefulness and sleep.⁴ The homeostatic pressure for sleep varies according to the prior duration of sleep and wakefulness and reflects sleep need. Sleep need rises during waking, and thus increases with prolonged wakefulness or sleep deprivation (SD), and declines during sleep. The dynamics of specific markers such as electrocorticographic (ECoG) delta power (1-4 Hz) measured during non-rapid eye movement sleep (NREMS) indexes homeostatic sleep pressure.^{5,6} The circadian process modulates sleep timing, duration and organization,⁴ and is controlled by the master clock located in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN) in mammals. Circadian regulation depends on a molecular transcriptional-translational feedback loop that involves the core clock transcription factors CLOCK and BMAL1, which form a complex that activates gene expression via binding to specific DNA sequences (i.e., E-boxes).⁷

Both sleep regulatory processes seem to be linked to changes in synaptic functioning and therefore to mechanisms regulating synaptic plasticity. On the one hand, NREMS delta activity, the main marker of sleep homeostasis, is both impacted by and impacting synaptic communication. For instance, altering the activity of plasticity mediators, such as N-methyl-D-aspartate glutamate receptors, with the use of antagonists modulates NREMS delta power,^{8,9} while delta oscillations during NREMS contribute to changes in synaptic strength through a glutamate receptor-dependent mechanism.¹⁰ On the other hand, synaptic plasticity events are also relevant to circadian regulation.¹¹ Indeed, in the SCN, neuronal firing rate is lower during the active period than the inactive period,¹² and the number of glutamatergic synapses on SCN vasoactive intestinal peptide (VIP) neurons is lower during the night than the day.¹³ In addition, molecular elements governing the circadian clock transcriptional-translational feedback loop, also called clock genes, appear to shape synaptic function outside the SCN, as mice carrying clock gene mutations show deficits in synaptic plasticity in the hippocampus.^{14,15} Consequently,

although most underlying mechanisms remain to be defined, synaptic modifications play roles in the physiology of both sleep regulatory processes.

Our recent work on Neuroligin-1 (NLGN1) supports a role for synaptic adhesion systems regulating glutamate transmission in sleep regulation, and implicates clock genes in this pathway.¹⁶ In the adult brain, ephrins and their Eph receptors are also implicated in the regulation of neuronal and neuron-glia communications.¹⁷ EphA4, in particular, regulates synaptic strength by down-regulating the expression of AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) glutamate receptors,¹⁸ and mice lacking EphA4 exhibit impairments in both functional and morphological plasticity.¹⁹⁻²¹ These observations thus place EphA4 in a strategic position to act as a modulator of synaptic activity as a function of wakefulness and sleep.

Here, we verified the role of EphA4 in sleep regulation using ECoG recording in *EphA4* knockout (KO) mice performed during baseline condition and after SD, and using gene expression measurements. First, we measured vigilance state duration and ECoG spectral activity during wakefulness and sleep with a particular focus on electrophysiological markers of circadian and homeostatic sleep regulation (i.e., dynamics of NREMS delta and sigma activity).^{22,23} Because SD extensively affects the brain transcriptome,²⁴⁻²⁷ we also assessed the gene expression response to SD in *EphA4* KO mice using quantitative PCR (qPCR) and microarray. In addition, we evaluated the impact of both SD and time-of-day on the expression of elements of the ephrin/Eph system in three different brain regions in C57BL/6J mice. Lastly, the possibility that EphA4 represents an output from the circadian system was verified by measuring its expression in *Clock* ^{Δ 19} mutant mice and in the SCN, and by quantifying the expression of the major SCN neuropeptides in *EphA4* KO mice. Our observations support a role for the ephrin/Eph system in sleep regulation.

MATERIAL and METHODS

Animals and Protocols

Mice (all males) were maintained under standard housing conditions (food/water *ad libitum*, 22-25°C, 12h light: 12h dark [LD12:12]). *EphA4* mutant mice²⁸ were generously given by Keith K. Murai (McGill University) and bred on-site. Homozygous *EphA4* KO mice, and heterozygote (HET) and wild-type (WT) littermates were used for ECoG, quantitative PCR (qPCR), microarray,

neurological assessment, and *in situ* hybridization. The ECoG of 44 mice (n = 13 KO [12.1 ± 0.3 weeks old, 21.1 ± 0.6 g], 16 HET [11.9 ± 0.2 weeks old, 23.1 ± 0.4 g], 15 WT [11.8 ± 0.2 weeks old, 24.4 ± 0.6 g]; significant genotype effect on weight $F_{2,41} = 9.3$, $p < 0.01$) was recorded during a 24 h baseline, during a 6 h SD starting at light onset (Zeitgeber time 0: ZT0), and during 18 h of recovery. One week after the ECoG measurement, some of the same mice were sacrificed at ZT6 (6 h after light onset) under undisturbed condition (n = 4 KO, 4 WT) or after a second 6 h SD (n = 5 KO, 6 WT), and forebrains (hindbrain excised) were used to measure the gene expression response to SD. Neurological function was evaluated at two times (ZT0 and ZT11) in a different cohort of mice (n = 7 KO [9.9 ± 0.2 weeks old, 20.5 ± 0.6 g], 7 HET [10.1 ± 0.2 weeks old, 22.3 ± 1.0 g], 10 WT [10.3 ± 0.3 weeks old, 24.2 ± 0.6 g]; significant genotype effect on weight $F_{2,21} = 6.6$, $p < 0.01$).

The effect of SD on mRNA expression of targeted Eph receptors and ephrins was measured in the cerebral cortex, hippocampus and, to ensure rapid dissection, a region covering the thalamus and hypothalamus in C57BL/6J (B6) mice (12 weeks old) sacrificed at ZT6 after a 6 h SD (n = 6-7) or under undisturbed condition (n = 5-7). SD was performed by gentle handling.²⁹ The effect of time-of-day on mRNA expression of the specific Eph receptors and ephrins in the same three brain regions was measured in B6 mice sacrificed at ZT0, ZT6, ZT12 and ZT18 under undisturbed condition (n = 4-5 per time, 10.5 weeks old). *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} mutant mice and WT littermates were the same animals as those used in a previous study,³⁰ for which sacrifice was performed every 6h under LD12:12 (ZT2 = 2h after light onset, ZT8, ZT14, ZT20; n = 4-5 per genotype per time). Right forebrains were dissected from previously frozen whole brains. All mice used for qPCR gene expression measurements were sacrificed by cervical dislocation.

For *in situ* hybridization measuring *EphA4* expression, two WT CD-1 mice (5 weeks old) and two male Sprague-Dawley rats (225-250g; Charles River Laboratory) were injected with a lethal dose of ketamine/xylazine (80/10 mg/kg, ip) around ZT6, and perfused through the heart with 4% paraformaldehyde in sodium tetraborate 0.1 M pH 9.5. For *in situ* hybridization measuring *Vip*, *Grp* and *Avp* expression, three *EphA4* KO mice (14.7 ± 2.8 weeks old) and three WT littermates (14.7 ± 2.8 weeks old) were sacrificed by cervical dislocation around ZT6, and brains were immediately embedded in O.C.T. Compound (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and frozen. Experiments were approved by Animal Care and Use Committees (Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Douglas Mental Health University Institute, Comité de déontologie de l'expérimentation animale Université de Montréal).

Vigilance State Analyses

Epha4 KO mice and littermates were implanted for ECoG and electromyography (EMG) as detailed previously.¹⁶ ECoG/EMG was recorded 10 d post-surgery for 48 h (24 h baseline, 6 h SD and 18 h recovery, see above). Signals were recorded and processed as done previously.¹⁶ Wakefulness, NREMS and REMS were visually assigned to each 4-sec epochs, and total durations were calculated for the 12 h light and dark periods, and expressed as a percent total recording time. Mean duration of vigilance state bouts was averaged per light and dark periods and per h. The total number of REMS bouts, and number of short (32 sec) and long (4 min and 16 min) episodes of vigilance states were calculated for the 12 h light. Sleep latency after SD was calculated as the time between the end of the SD and the first sleep episode lasting ≥ 1 min, and not interrupted by more than two consecutive 4-sec epochs scored as wakefulness. NREMS lost was calculated as the difference between NREMS during SD and the corresponding 6-h interval during baseline. The effect of SD and recovery on NREMS and REMS duration was assessed using accumulated differences from the corresponding baseline values. ECoG spectral analysis was performed using Fast Fourier transform (FFT) to calculate 24 h mean power between 0.75 and 30 Hz per 0.25 Hz for the three vigilance states. Two mice were removed from baseline spectral analyses and SD sleep architecture analyses, and one additional mouse for SD spectral analyses because of artifacts. Spectra were normalized to total activity of all Hz-bins in all states. The time course of delta (1–4 Hz) and sigma (10-13 Hz) activity during NREMS was calculated using averages per equal intervals as done previously,¹⁶ and expressed in percent of the 24 h mean baseline for each mouse.

EMG and Neurological function

Epha4 KO mice have dysfunctions in motor coordination and locomotion.²⁸ We verified the impact of these dysfunctions on EMG tone using spectral analysis. The bipolar EMG signal of artifact-free epochs was submitted to FFT to calculate the 24 h mean baseline power between 10 and 64 Hz during vigilance states. Spectral power was normalized by expressing the activity in each state in percent of the total power for all states (3 mice were excluded because of artifacts). Neurological function was evaluated at the beginning and end of the rest phase (ZT0 and ZT11) in *Epha4* KO mice and littermates using a standardized 10-point Neurological Severity Score (NSS) as previously described,¹⁶ which assesses motor function, physiological behavior and alertness.

Quantitative PCR (qPCR)

RNA was extracted using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit or the RNeasy Plus Universal Midi kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada), and quality was verified using agarose gel electrophoresis and a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA USA). For reverse transcription, 0.5 µg of RNA was used with random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), according to manufacturer's procedures. Quantitative PCR was performed using a ViiA7 real-time cycler (Life Technologies). cDNA were diluted and used in 10 µL reaction with Standard or Fast TaqMan Master Mix reagent (Life Technologies). Primers were purchased from Invitrogen, Life Technologies, or Operon (Huntsville, AL), and probes from Eurogentec (Seraing, Belgium) or Operon. Sequences of designed oligos or Taqman Gene Expression Assay numbers are provided in Table 1. The most stable endogenous controls were selected among *Actin*, *Tbp*, *GusB* and *Rps9* using Expression Suite v1.0 (Life Technologies), and 2 or 3 controls were used to perform relative quantification using a modified $\Delta\Delta C_t$ method (Expression Suite v1.0, Life Technologies).

Microarray analyses

Sense-strand cDNA synthesis, fragmentation, labeling, hybridization and microarray scanning were performed by McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, QC, Canada). A synthesized sense-strand cDNA was generated from 250 ng of total RNA using the Ambion® WT Expression kit according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Fragmentation and labeling of the cDNA were done with the Affimetrix GeneChip® WT Terminal Labeling kit also according to the manufacturer's instruction (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA). DNA was hybridized on Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) and incubated at 45°C in a Genechip® Hybridization oven 640 (Affymetrix) for 17 h at 60 rpm. Arrays were then washed in a GeneChips® Fluidics Station 450 (Affymetrix) using Affymetrix Hybridization Wash and Stain kit according to the manufacturer's instructions (Affymetrix). Lastly, microarrays were scanned on a GeneChip® scanner 3000 (Affymetrix). All microarray analyses were performed using R (R Core, 2004, www.R-project.org) and Bioconductor packages (www.Bioconductor.org) similar to our previous publication.²⁷ Normalized expression signals were calculated from Affymetrix CEL files using the RMA function of the oligo Bioconductor package.³¹ Control and low intensity probesets were removed prior to the differential expression analysis, leaving 22,568 probes for statistical analysis. Differential expressions were computed using the Bioconductor package "limma".³² A linear model was fit for each gene, and comparisons of interest were extracted as contrasts (KO-control, KO-SD, WT-control, WT-SD). P values were adjusted for multiple testing

with the Benjamini and Hochberg method to control the false discovery rate (FDR).³³ A gene was called differentially expressed if its FDR was lower than 0.05.

***In situ* Hybridization**

In situ hybridization for *EphA4* was done as described elsewhere.³⁴ Briefly, fixed brains were post-fixed, cryopreserved and sectioned in 30 μm -thick sections. A 313 bp fragment of the *EphA4* gene (NM_007936.3) was used for probe synthesis (construct generously provided by E. Pasquale), and inserted in pGEM-7Z(+) plasmids in opposite orientations to produce ³⁵S-labeled sense and antisense riboprobes (T7 promoter). Probes were synthesized from 250 ng of linearized plasmids in transcription buffer 5X, 10 mM dithiothreitol, 0,2 mM R-ATP/GTP/CTP, 100 μCi $\{\alpha\text{-}^{35}\text{S}\}$ UTP, 40 U RNasin, and 20 U of RNA polymerase, and purified on mini Quick-Spin RNA columns (Roche Diagnostics, Mississauga, ON, Canada). Dehydrated slides were hybridized with 10^7 cpm of riboprobe in 1 ml of hybridization buffer. Sections were treated with RNase A (10mg/ml), defatted in xylene, and slides were exposed on autoradiography film (KODAK BioMax, MR) during 15 d or dipped in liquid emulsion (Kodak NTB2) for light microscopy after 30 d.

In situ hybridization for *Vip*, *Grp*, and *Avp* was performed largely as described previously³⁵ for *EphA4* KO mice and WT littermates. In brief, 25 μm fresh-frozen brain slices were hybridized over-night at $\sim 67^\circ\text{C}$ with DIG-labeled riboprobes. They were then incubated over-night in 1:5000 anti-DIG-AP conjugated antibody (Roche) at 4°C and colorimetrically visualized the next day. Brightfield images were taken and stitched on an Axioskop 2 Mot Plus (Zeiss Microscopy). After blinded cell counts, total number of cells per hemisphere were estimated for each mouse (n = 3 per genotype).

Statistics

Vigilance state variables, spectral analysis data, NSS and gene expression measurements were compared using one-way or two-way analyses of variance (ANOVAs) with a repeated-measure design when appropriate. Effects were decomposed using post hoc Tukey tests, t tests or planned comparisons. Significance level for repeated-measure analyses was adjusted using Huynh–Feldt correction. SCN cell counts were compared between genotypes using paired two-tailed t tests. Threshold for statistical significance was set to 0.05 and data are reported as mean \pm SEM.

RESULTS

Altered REMS and sleep consolidation in *EphA4* KO mice

During the 24 h baseline, the duration of wakefulness and NREMS did not significantly differ between *EphA4* KO mice and WT littermates. However, REMS duration was significantly lower in KO than WT mice during the light period (Figure 1A). This likely results from a lower number of REMS bouts (KO 75.5 ± 3.5 , WT 87.2 ± 4.7 , $p = 0.08$). The consolidation of vigilance state alternation, particularly that of wakefulness and NREMS, was also altered in *EphA4* KO mice. KO mice showed longer bouts of wakefulness and NREMS than WT mice specifically during the light period (Figure 1B). The time course of the mean duration of NREMS bouts differed between genotypes with longer bouts in KO compared to WT mice found at the beginning and end of the light period (Figure 1C). In parallel, the number of short wakefulness and NREMS bouts (32 sec) was lower in KO than in WT mice, whereas the number of long bouts of NREMS (4 min) and wakefulness (16 min) was higher in KO mice compared to WT or HET (Figure 1D). HET mice did not significantly differ from WT or KO mice, except for three variables for which a significant difference from KO was observed (wakefulness bout mean duration during light, number of 16 min bouts of wakefulness and of 4 min bouts of NREMS). In sum, the absence of *EphA4* impaired REMS occurrence during the light period, which was accompanied by more consolidated episodes of wakefulness and NREMS.

Neurological function deficit in *EphA4* KO mice

To verify that changes in wakefulness/sleep architecture in *EphA4* KO mice did not result from a modified state identification caused by state-specific alterations in muscle tone, total EMG activity was compared between genotypes for each vigilance state. Although EMG activity seemed higher in KO mice in all vigilance states (Figure 1E), no significant difference was observed between genotypes. Nevertheless, a significant deficit in neurological function was found (Figure 1F), which was not influenced by time-of-day, and which adds to the literature showing dysfunctions in motor control and locomotion in these mice.²⁸

Blunted dynamics of NREMS sigma activity in *EphA4* KO mice

Power spectra during wakefulness and REMS were not significantly affected by the mutation (Figure 2A). During NREMS, KO mice showed less delta/low theta activity than WT mice (Figure 2A). However, the time course of delta activity during NREMS measured under undisturbed conditions did not significantly differ with genotype (Figure 2B, upper panel). In contrast, the

daily dynamics of NREMS sigma activity was significantly blunted in *EphA4* KO mice compared to WT mice (Figure 2B, lower panel), with KO mice showing lower sigma activity when WT expressed their maximum (end of light period) and higher sigma when WT mice expressed low activity (mid-dark period). Given that the time course of individual sigma frequency bins in humans was shown to differentially index circadian and homeostatic influences,³⁶ the time course of individual bins between 10 and 13 Hz was compared between genotypes (Figure 2C). Blunted dynamics were significant specifically for the 10-11 and 11-12 Hz-bins, whereas the dynamics of 12-13 Hz activity, which seemed more strongly influenced by homeostatic sleep pressure, was not significantly affected by genotype.

Preserved response to SD in *EphA4* KO mice

ECoG: To further explore if *EphA4* has a role in sleep homeostasis, we measured the electrophysiological response to SD in *EphA4* KO mice. During the light period (first 6 h of recovery after SD because no REMS was observed during SD), REMS duration in KO mice was significantly lower than in WT and HET mice (Figure 3A), as it was observed during baseline. Here, reduced REMS duration seemed to result from shorter individual REMS bouts (Figure 3B). Sleep latency after SD, NREMS occurring during SD and NREMS loss during SD did not significantly differ between genotypes (Figure 3C). Moreover, the three genotypes not only lost a similar amount of NREMS during SD, but also expressed a similar rebound of NREMS duration during recovery (Figure 3D). The time course of REMS loss and recovery also did not significantly differ with genotype (Figure 3D). Furthermore, the time course of delta activity during NREMS after SD and of theta activity during wakefulness measured during and after SD did not significantly differ with genotype (Figure 3E). Nevertheless, the dynamics of NREMS sigma activity (10-13 Hz) and specifically of the 12-13 Hz-bin was affected by genotype, with HET mice showing higher activity in the first recovery hours after SD (Figure 3E and F).

Gene expression: We also investigated the role of *EphA4* in the response to SD by measuring forebrain gene expression in *EphA4* KO mice, with an initial focus on genes reported to be consistently increased by SD (i.e., *Arc*, *Bdnf*, *Fos* and *Homer1A*).^{26,27} The expression of *EphA4*, of two recognized ligands of *EphA4*, *EfnB3* and *EfnB2*, and of a gene linked to DNA methylation that is modified by SD (i.e., *Mat2b*)³⁷ was also measured. SD significantly increased the expression of *Arc*, *Bdnf*, *Fos* and *Homer1A* in both WT and KO mice (Figure 4A). The expression of *EphA4* was not detectable in *EphA4* KO mice, which confirmed the absence of the transcript. In WT mice, its expression tended to be increased by SD ($P = 0.1$). *EfnB2* expression was

significantly higher in *EphA4* KO than in WT mice, but no interaction with SD was found. The effect of SD on the expression of *EfnB3* tended to differ between genotypes, while the effect of SD on *Mat2b* was significantly affected by genotype (Figure 4A). This differential effect of SD resulted from a higher expression in KO than in WT mice under undisturbed/non-sleep deprived condition.

Because *Mat2b* codes for a protein regulating the synthesis of S-adenosylmethionine,³⁸ a methyl donor involved in DNA methylation reactions, the observation of an increase in KO mice could suggest alterations in transcriptional regulation. Therefore, we measured the impact of the mutation and of SD on genome-wide forebrain gene expression using microarray. SD significantly changed the expression of 457 probes, including many of the transcripts known to be consistently modified by SD (e.g., *Arc*, *Bdnf*, *Hspa5*, *Sgk1*, *Nr4a1*, *Dnajb5*, *Cdkn1*, *Dio2*, *Vip*). When analyzing the effect of SD separately in KO and WT mice, 166 probes were significantly changed in KO mice and 131 probes in WT mice, with an overlap of 67 probes (Figure 4B). However, besides *EphA4*, no genome-wide significant Genotype effect was found. Moreover, only two probes showed a significant Genotype-by-SD interaction, one predicted gene (Gm7008) and *Olfr661* (olfactory receptor 661). Overall, forebrain gene expression changes after SD were thus similar in *EphA4* KO and WT mice (Figure 4C).

SD and Time-of-Day affect the expression of *EphA4* and related elements

Given our finding of alterations in sleep macro- and microarchitecture in *EphA4* KO mice, we investigated if homeostatic sleep pressure and time-of-day modulate the expression of specific elements of the ephrin/Eph system in B6 mice. This was specifically verified for two brain regions involved in sleep regulation, the cerebral cortex and a region covering the thalamus and hypothalamus, as well as for the hippocampus, which expresses high levels of *EphA4*²¹ and is particularly sensitive to SD.³⁹ *Fos* expression was used as a positive control of the effect of SD, and was significantly increased by SD in all regions (Figure 5A). Interestingly, only *EphA4* showed a significant increase after SD and only in the thalamic/hypothalamic region (Figure 5A). In all three brain areas, the expression of *EphA4* and *EfnB2* was not significantly modified by time-of-day (Figure 5B). However, in the cerebral cortex, a rhythmic expression was found for *EphB2* and *EfnB3* showing peak expression at ZT18 and ZT12, respectively. In the hippocampus, *EfnA3* expression was significantly lower at ZT12 than at other times. In the thalamic/hypothalamic region, opposite rhythms were found for *EfnA3* and *EfnB3* expression which, respectively, showed lower and higher expression at ZT12 than at ZT0 (Figure 5B). Overall, the expression of

EphA4 and of targeted members of the same system responded to SD or time-of-day in a brain area-dependent manner.

EphA4 and ephrins expression is reduced in *Clock* mutant mice

Since the sleep phenotype in *EphA4* KO mice included variables under circadian control (REMS, sleep consolidation, sigma dynamics),^{23,40} and because *EphA4* expression was affected by SD in the thalamic/hypothalamic region, we suspected that *EphA4* might represent an output from the circadian system and that its expression could be controlled by clock elements. In support of this, we observed that the putative promoter regions of *EphA4* and one of its ligands, *EfnB3*, contains many predicted E-box sequences (CANNTG) in both the mouse and rat genomes (Figure 6A). Since the core clock transcription factors CLOCK and BMAL1 are known to bind to E-boxes in their target genes,⁷ we evaluated if the expression of *EphA4* and other ephrin/Eph is controlled by CLOCK. To do this, we measured the expression of ephrin/Eph-coding genes in *Clock* mutant mice at 4 different times. We found that the expression of *EphA4*, *EfnA3* and *EfnB2* was significantly decreased in the forebrain of *Clock* mutant mice (Figure 6B). In addition, we tested whether *EphA4* is expressed in the central circadian clock using *in situ* hybridization on mouse and rat brains. We indeed found *EphA4* expression in the SCN (Figure 6C, D), in addition to high expression in the cerebral cortex and striatum and modest expression in other hypothalamic and thalamic nuclei (Figure 6D).

Preserved cell number expressing SCN neuropeptides in *EphA4* KO mice

Given our observation of *EphA4* expression in the SCN, and given that *Vip* KO mice exhibit a decrease in REMS specifically in the light period,⁴¹ and that another adhesion molecule, PSA-NCAM, regulates VIP neuron number in the SCN,⁴² a developmental change in SCN neuropeptide disposition could represent a mechanism underlying the sleep phenotype observed in *EphA4* KO mice. As a first attempt to evaluate the role of *EphA4* in SCN development, we quantified the expression of *Vip*, *Grp* and *Avp* in *EphA4* KO mice. However, the number of SCN neuropeptide-positive cells was not significantly different in *EphA4* KO mice compared to WT littermates for all three neuropeptides studied (Figure 7). In addition, the overall morphology of SCN subdomains demarcated by these neuropeptides appeared to be intact. Thus, these observations support that a developmental change in the pattern of expression of SCN neuropeptides is unlikely to contribute to the sleep alterations observed in *EphA4* KO mice.

DISCUSSION

Our findings point to an implication of the ephrin/Eph system, and particularly of EphA4, in sleep regulation. We first report that, under baseline condition, mice not expressing *EphA4* have less REMS and longer bouts of wakefulness and NREMS during the rest period. This was accompanied by a blunted dynamics of sigma activity during NREMS. Nevertheless, the electrophysiological and molecular response to SD in KO mice was similar to that of WT mice, except for the expression of *Mat2b*, which was significantly higher in KO mice under control condition. Furthermore, we highlighted that the expression of *EphA4* and members of its system is modulated by homeostatic sleep pressure and by daytime in different brain areas linked to sleep, and that some of these genes contain *cis* clock regulatory elements and have their expression modified in *Clock* mutant mice. Overall, these findings and the observation that *EphA4* mRNA is expressed in the SCN support an implication of this specific adhesion protein in circadian sleep regulation.

The sleep phenotype of animals lacking EphA4 is reminiscent of a preserved sleep homeostat but of an altered circadian regulation of sleep. Indeed, although NREMS delta activity was generally decreased in *EphA4* KO mice, its dynamics during baseline and after SD, which indexes sleep homeostasis, was indistinguishable from that of WT mice. Conversely, we observed that several sleep variables under circadian control were altered in *EphA4* KO mice. First, the daily dynamics of NREMS sigma activity, which has been linked to circadian regulation,^{23,36} was blunted. Moreover, *EphA4* KO mice showed decreased REMS duration specifically during the light period in baseline, and the distribution of REMS is another sleep parameter under the influence of the circadian clock.⁴⁰ The decrease in REMS duration in the light period only is still present after SD, indicating a robust phenotype, whereas changes in wakefulness and NREMS bout duration and of sigma dynamics after SD appear to override the between-genotype difference for these variables. These results could thus suggest that the loss of EphA4 impacts the circadian regulation of sleep.

Interestingly, under baseline conditions, decreased REMS duration was accompanied by more consolidated wakefulness and NREMS, as reflected by longer individual bouts. This could suggest that a lowered pressure for REMS might be permissive to enhance consolidation of other states in mice. Reduced REMS duration accompanied by longer wakefulness and NREMS bouts has also been reported in *Vip* KO mice.⁴¹ Of note is that enhanced wakefulness and

NREMS consolidation in *EphA4* KO mice do not occur in combination with better cognitive functions. On the contrary, *EphA4* KO mice express spatial memory deficits,⁴³ in addition to impaired locomotion and neurological function. Memory deficits could be related to decreased REMS duration and altered sigma activity because REMS and sleep spindles (associated with NREMS sigma activity) have been linked to hippocampus-dependent and independent memory.^{1,44-47} Nevertheless, memory deficits of *EphA4* KO mice could be independent from sleep alterations and rather result from other abnormalities in brain circuitry. Accordingly, future work should assess if sleep alterations contribute to memory impairments in *EphA4* KO mice.

In addition to the electrophysiological response to SD, the gene expression response to SD was also highly similar in *EphA4* KO and WT mice, further supporting a minor role, if any, for *EphA4* in sleep homeostasis. The expression of the main immediate early genes was increased by SD independent of genotype, and in a manner similar to previous studies.^{48,49} Also, the genome-wide gene expression response to SD was not significantly affected by genotype, and resembled that previously reported for the forebrain using microarray,^{26,27} even if the absence of *EphA4* differentially affected the expression of *Mat2b*, a transcriptional regulator.⁵⁰ Nevertheless, the expression of *EphA4* itself responded to SD in the thalamus/hypothalamus potentially suggesting a modulatory role under elevated sleep pressure. Our future work will aim at defining the functional significance of this change in normally developed animals.

Importantly, our results reveal a pathway by which clock elements can be linked to synaptic activity in various brain areas. We indeed report that ephrin/Eph elements 1) are expressed in a rhythmic manner, 2) present *cis* regulatory elements in their genes that might mediate regulation by clock transcription factors, and 3) have an altered expression in *Clock* mutant mice. The presence of E-boxes in *EphA4* and *EfnB3* genes does not necessarily implicate transcriptional regulation by core clock factors because E-box elements are not all functional. The functionality of identified elements will thus need to be verified using *in vitro* mutagenesis assays.^{30,51} Nevertheless, this observation in combination with findings of rhythmic expression of specific ephrin/Eph in different brain regions and of decreased *EphA4*, *EfnA3* and *EfnB2* expression in *Clock* mutant mice suggest regulation by core clock transcription factors. This last observation was likely enabled by the absence of compensation by other partners of BMAL1, such as NPAS2, given the dominant negative nature of the *Clock*^{Δ19} mutation.⁵² Yet, regional differences in the rhythmic expression of the different ephrin/Eph may originate from

differential transcriptional regulation by different clock elements (e.g., NPAS2 vs. CLOCK). Indeed, CLOCK and BMAL1 may regulate the rhythmic expression of some ephrin/Eph elements in certain brain areas, whereas NPAS2 and BMAL1 may regulate the expression of the same or different ephrin/Eph in other regions. This is in agreement with the reported brain area-specificity in ephrin/Eph expression and with their various roles in neuronal function.¹⁷ In the hippocampus specifically, given the high expression of *EphA4*,²¹ and our finding of rhythmic expression of its ligand *EfnA3*, control of ephrin/Eph by clock elements may represent a route by which synaptic plasticity varies with time-of-day.⁵³ Such pathway could contribute to deficits in hippocampal long-term potentiation (LTP) in animals with clock gene mutations.^{14,15} In the cerebral cortex, rhythmic expression of *EphB2* and *EfnB3* may also impact on synaptic activity as well as plasticity. Lastly, rhythmic expression of EphA4 ligands (*EfnA3*, *EfnB3*) in the thalamus/hypothalamus could contribute to the circadian sleep phenotype observed here given the numerous thalamic/hypothalamic nuclei involved in sleep regulation.

Considering that *EphA4* is expressed in the SCN, it is also tempting to speculate that its modulatory effects on circadian sleep variables originate from the SCN. The absence of EphA4 was shown to impair synaptic potentiation as measured by LTP,⁵⁴ which was linked to the role of EphA4 in neuron-astrocyte communication.^{17,20,21} Interestingly, astrocytic coverage in the SCN varies with time-of-day,¹³ which represents a form of structural plasticity that modulates neurotransmission.⁵⁵ This is presumably dependent on astrocytes cytoskeletal rearrangement, which was shown to be attenuated in *EphA4* KO astrocytes in culture.⁵⁶ A role of EphA4 in SCN structural plasticity could contribute to rhythmic changes of the SCN output signal, without necessarily altering SCN neuropeptide expression. Co-localization experiments assessing the SCN cell type(s) where *EphA4* is expressed according to time and measuring circadian behavior in constant darkness in *EphA4* KO mice will be required to define the contribution of this receptor to the circadian timing system.

Alternatively, developmental effects of the absence of EphA4 on sleep-relevant circuits could underlie the sleep phenotypes observed in *EphA4* KO mice. Preservation of the number of cells expressing the main SCN neuropeptides in *EphA4* KO mice suggests that developmental effects on SCN cell fate selection are not responsible. However, this does not rule out other possible developmental contributions. For example, *EphA4* KO mice were shown to have a loss of the anterior commissure,²⁸ which mediates inter-hemispheric communication of numerous brain regions. Furthermore, *EphA4* KO mice have a thinner cerebral cortex,⁵⁷ and an altered

development of ventral trigeminal axons innervating the somatosensory cortex.⁵⁸ These or other structural/circuit abnormalities, related to the role of EphA4 in axon guidance,⁵⁹ could thus specifically impact REMS duration, sleep consolidation variables, and ECoG activity. However, circuit abnormalities in most regions cannot fully explain why *EphA4* KO mice are showing altered sleep architecture variables only at certain times of the day (e.g., less REMS and longer NREMS bouts during the light period) and opposed changes in ECoG activity at opposite times of the day under baseline conditions (e.g., lower sigma in KO than WT during the light period but higher in KO than WT during the dark period). Aside from the SCN, these changes could originate from abnormalities in brain circuits controlling the daily pattern of, for instance, REMS such as the circuit encompassing the sublaterodorsal tegmental nucleus, which mainly expresses glutamate.⁶⁰ In the KO mice studied here, a minimal effect of developmental compensation by other molecules is expected upon the sleep phenotype observed, because changes in dendritic spine morphology in *EphA4* KO mice do not seem to be compensated for by other ephrins/Eph.¹⁹ Nevertheless, we have observed a higher *EfnB2* expression in *EphA4* KO mice than in WT mice. Consequently, replication of our findings using targeted downregulation (or overexpression) strategies will be required to identify the precise brain circuits by which EphA4 (and ligands) regulate sleep architecture as well as ECoG activity.

To our knowledge, this is the first study implicating the ephrin/Eph system in sleep regulation. Importantly, in light of the role of EphA4 in synaptic plasticity, an implication of EphA4 in neurodegenerative diseases has been described. In fact, Alzheimer's disease [AD] patients exhibit a 2-fold increase in *EphA4* mRNA in synaptoneuroosomes,⁶¹ and the intracellular signaling of EphA4 is involved in synaptic transmission impairment in animal models of AD.^{62,63} Interestingly, AD patients and also animal models for AD have disturbances in the sleep-wake cycle and circadian rhythms.⁶⁴ Accordingly, our findings support the hypothesis that the same molecular elements are simultaneously regulating cognitive functioning and sleep quality and quantity, and thus that dysfunctions in neuronal circuitry or plasticity originating from the absence of such elements are responsible for both memory and sleep alterations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Chloé Provost, Caroline Bouchard, Hélène Blais, Alexis Blanchet-Cohen, Gaétan Tremblay, Renaud Massart, Abhijith Bathini and Gaétan Poirier for technical help, Paul Franken, Samer Hattar and J-Martin Beaulieu for helpful discussions and advice, Keith K. Murai for providing animals for initial breeding, and Elena B. Pasquale for providing the *EphA4* construct for *in situ* hybridization.

LEGENDS

Figure 1 - (A) Mean duration of vigilance states expressed in percent total recording time calculated for baseline light and dark periods in *EphA4* KO mice and littermates. A significant Genotype effect was observed for REMS during the light period ($F_{2,41} = 3.3$, $P < 0.05$). Stars show significant differences ($P < 0.05$) between indicated points (also for **B** and **D**). **(B)** Mean duration of vigilance state bouts during light and dark periods. A significant Genotype effect was found for wakefulness ($F_{2,41} = 4.3$, $P = 0.02$) and NREMS ($F_{2,41} = 3.9$, $P = 0.02$) during the light period. **(C)** 24 h time course of vigilance state bout duration. A significant Genotype-by-Time interaction was found for NREMS ($F_{46,943} = 1.9$, $P = 0.001$). Red symbols show significant differences compared to WT. **(D)** Number of vigilance state bouts of different durations calculated over the light period. A significant Genotype effect was observed for short (32 sec) and long (16 min) bouts of wakefulness ($F_{2,41} > 3.9$, $P < 0.03$) and short (32 sec) and long (4 min) bouts of NREMS ($F_{2,41} > 4.2$, $P < 0.05$). **(E)** Relative EMG spectral power between 10 and 64 Hz averaged for 24 h in *EphA4* KO mice and littermates. No significant Genotype effect was found (wakefulness: $F_{2,38} = 0.5$, $P = 0.5$; NREMS: $F_{2,38} = 1.4$, $P = 0.3$; REMS: $F_{2,38} = 2.2$, $P = 0.1$). **(F)** Neurological severity score measured in *EphA4* KO mice and littermates at ZT0 and ZT11. A significant Genotype effect was found ($F_{2,21} = 11.8$, $P < 0.01$). NSS was significantly higher in KO mice than in WT and HET mice ($P < 0.003$; Genotype effect indicated by stars).

Figure 2 - (A) Normalized spectral power between 0.75 and 30 Hz in *EphA4* KO mice and littermates for the three vigilance states. Significant Genotype effect was found for NREMS low frequencies ($F_{2,39} > 3.5$, $P < 0.05$). Red symbols show significant differences compared to WT (also for **B** and **C**). **(B)** 24 h dynamics of relative NREMS delta and sigma activity in *EphA4* KO mice and littermates. A significant Genotype-by-Interval interaction was found for sigma activity

($F_{34,663} = 2.0$, $P = 0.01$). **(C)** Dynamics of NREMS sigma activity for individual 1-Hz bins. Significant interactions were found for 10-11 Hz and 11-12 Hz ($F_{34,663} \geq 1.9$, $P \leq 0.01$).

Figure 3 - (A) Mean duration of vigilance states expressed in percent total recording time calculated for light and dark periods in *EphA4* KO mice and littermates during and after a 6 h SD. A significant Genotype effect was observed for REMS during the light period ($F_{2,39} = 5.2$, $p < 0.01$). Stars show significant differences (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$) between indicated points (also for **B**). **(B)** Mean duration of vigilance state bouts during light and dark periods calculated during and after a 6 h SD. A significant Genotype effect was found for REMS ($F_{1,26} = 6.3$, $P = 0.001$) during the light period. **(C)** Sleep onset latency after SD, NREMS measured during SD and NREMS lost during SD did not significantly differ between genotypes ($F_{2,39} \geq 1.7$, $P \geq 0.2$). **(D)** Time course of accumulated differences between the 6 h SD followed by 18 h of recovery and baseline conditions for NREMS and REMS. No Genotype effect or interaction was observed (respectively, $F_{2,39} \leq 0.3$, $P \geq 0.7$; $F_{46,897} \leq 1.1$, $P \geq 0.3$). **(E)** 24 h dynamics of NREMS delta and sigma activity after SD and of wakefulness theta activity during and after SD in *EphA4* KO mice and littermates. Significant interaction was found for sigma activity ($F_{26,481} = 1.7$, $P = 0.04$). **(F)** Dynamics of NREMS sigma activity for individual Hz-bins. A significant interaction was found for 12-13 Hz ($F_{26,481} = 1.7$, $P < 0.05$).

Figure 4 - (A) Relative mRNA expression of target genes in the forebrain of *EphA4* KO and WT mice measured in control condition or after a 6h SD. A significant SD effect was found for *Arc*, *Bdnf*, *Fos* and *Homer1A* ($F_{1,15} \geq 11.6$, $P < 0.001$). A tendency for a SD effect was found for *EphA4* ($t = -1.7$, $P = 0.1$). A significant genotype effect was found for *EfnB2* ($F_{1,15} = 6.9$, $P < 0.02$). A significant Genotype-by-SD interaction was found for *Mat2b* ($F_{1,15} = 4.9$, $P < 0.05$), and a trend for such interaction was found for *EfnB3* ($F_{1,15} = 3.1$, $P = 0.09$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ between indicated points. **(B)** Venn diagrams representing the number of probes significantly ($FDR < 0.05$) changed by SD specifically in KO (grey circle) and in WT (blue circle) mice, and their overlap. **(C)** Heat maps of the 457 probes displaying an effect of SD with $FDR < 0.05$. Columns refer to individual microarray data (WT Control $n = 4$; WT SD $n = 6$; KO Control $n = 4$; KO SD $n = 5$). Transcripts were ordered by hierarchical clustering (complete linkage).

Figure 5 - Relative mRNA expression of *EphA4*, *EphB2*, *EfnA3*, *EfnB2* and *EfnB3* measured in the cerebral cortex, hippocampus and a region covering the thalamus and hypothalamus in B6 mice. **(A)** Expression measured under undisturbed condition or after SD. A significant effect of SD was found for the positive control gene *Fos* in each region ($t \geq -3.2$, $P < 0.02$) and for *EphA4* in the thalamic/hypothalamic region ($t = -2.5$, $P = 0.03$). *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ in comparison to the control condition. **(B)** Expression measured at 4 different Zeitgeber times (ZT0, 6, 12 and

18). A significant Time-of-day effect was found for *EfnB3* and *EphB2* in the cortex ($F_{3,15} > 4.1$, $P < 0.05$), for *EfnA3* in the hippocampus ($F_{3,15} = 5.2$, $P = 0.01$) and for *EfnA3* and *EfnB3* in the thalamic/hypothalamic region ($F_{3,15} > 3.7$, $P < 0.05$). Stars illustrate significant differences between indicated points ($P < 0.05$).

Figure 6 - (A) Diagram of the mouse and rat *EphA4* and *EfnB3* genes showing the position of E-boxes relative to the transcription start sites (arrows). Blue boxes represent E-boxes with the sequence CANNTG and red boxes, CACGTG (sequence with the highest affinity for CLOCK/BMAL1). Not to scale. **(B)** Expression of *EphA4*, *EphB2*, *EfnA3*, *EfnB2* and *EfnB3* measured in the right forebrain of *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} mutant mice at 4 different Zeitgeber times (ZT2, 8, 14 and 20). A significant genotype effect was found for *EphA4*, *EfnA3* and *EfnB2* ($F_{1,31} \geq 4.7$, $P \leq 0.03$). **(C)** Liquid emulsion autoradiography of *EphA4* *in situ* hybridization on brain sections covering the hypothalamic SCN of two different mice. Scale bar = 100 μm . **(D)** Film autoradiographs following *in situ* hybridization of *EphA4* mRNA on brain sections of two different rats. Red arrows indicate the SCN.

Figure 7 - (A) *In situ* hybridization of SCN using probes for *Vip*, *Grp*, and *Avp* shown for a representative *EphA4* KO mouse and WT littermate. Scale bar = 100 μm . **(B)** Group mean of estimated cell number per hemisphere expressing these main SCN neuropeptides did not significantly differ between *EphA4* KO and WT mice ($n = 3$ per genotype; *Vip* $t = 0.30$, $p = 0.78$; *Grp* $t = -0.02$, $p = 0.98$; *Avp* $t = 2.36$, $p = 0.14$).

REFERENCES

1. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:114-26.
2. Jagannath A, Peirson SN, Foster RG. Sleep and circadian rhythm disruption in neuropsychiatric illness. *Curr Opin Neurobiol* 2013;23:888-94.
3. Hatfield CF, Herbert J, van Someren EJ, Hodges JR, Hastings MH. Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain* 2004;127:1061-74.
4. Dijk DJ, Lockley SW. Integration of human sleep-wake regulation and circadian rhythmicity. *J Appl Physiol* 2002;92:852-62.
5. Achermann P, Dijk DJ, Brunner DP, Borbely AA. A model of human sleep homeostasis based on EEG slow-wave activity: quantitative comparison of data and simulations. *Brain Res Bull* 1993;31:97-113.
6. Borbely AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J Biol Rhythms* 1999;14:557-68.
7. Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2008;9:764-75.
8. Feinberg I, Campbell IG (1993) Ketamine administration during waking increases delta EEG intensity in rat sleep. *Neuropsychopharmacology* 1993;9:41-8.
9. Campbell IG, Feinberg I. Comparison of MK-801 and sleep deprivation effects on NREM, REM, and waking spectra in the rat. *Sleep* 1999;22:423-32.
10. Chauvette S, Seigneur J, Timofeev I. Sleep oscillations in the thalamocortical system induce long-term neuronal plasticity. *Neuron* 2012;75:1105-13.
11. Frank MG, Cantera R. Sleep, clocks, and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2014;37:491-501.
12. Deboer T, Vansteensel MJ, Detari L, Meijer JH. Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci* 2003;6:1086-90.
13. Girardet C, Blanchard MP, Ferracci G, et al. Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents. *Eur J Neurosci* 2010;31:359-70.
14. Wang LM, Dragich JM, Kudo T, Odom IH, Welsh DK, O'Dell TJ, Colwell CS. Expression of the circadian clock gene *Period2* in the hippocampus: possible implications for synaptic plasticity and learned behaviour. *ASN Neuro* 2009;1.
15. Rawashdeh O, Jilg A, Jedlicka P, et al. *PERIOD1* coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. *Hippocampus* 2014;24:712-23.
16. El Helou J, Belanger-Nelson E, Freyburger M, et al. Neuroigin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9974-9.

17. Murai KK, Pasquale EB. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist* 2004;10:304-14.
18. Fu AK, Hung KW, Fu WY, et al. APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci* 2011;14:181-9.
19. Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 2003;6:153-60.
20. Carmona MA, Murai KK, Wang L, Roberts AJ, Pasquale EB. Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12524-9.
21. Filosa A, Paixao S, Honsek SD, et al. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat Neurosci* 2009;12:1285-92.
22. Franken P, Dudley CA, Estill SJ, Barakat M, Thomason R, O'Hara BF, McKnight SL. NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: genotype and sex interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7118-23.
23. Yasenkov R, Deboer T. Interrelations and circadian changes of electroencephalogram frequencies under baseline conditions and constant sleep pressure in the rat. *Neuroscience* 2011;180:212-21.
24. Cirelli C, Tononi G. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res* 2000;885:303-21.
25. Mackiewicz M, Shockley KR, Romer MA, et al. Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics* 2007;31:441-57.
26. Maret S, Dorsaz S, Gurcel L, et al. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20090-5.
27. Mongrain V, Hernandez SA, Pradervand S, et al. Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep* 2010;33:1147-57.
28. Dottori M, Hartley L, Galea M, et al. EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13248-53.
29. Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbély AA. Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol* 1991;261:R198-208.
30. Mongrain V, Ruan X, Dardente H, Fortier EE, Cermakian N. Clock-dependent and independent transcriptional control of the two isoforms from the mouse Rorgamma gene. *Genes Cells* 2008;13:1197-210.
31. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 2010;26:2363-7.
32. Smyth G. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S, eds. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer, 2005:397–420:.

33. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B* 1995;57:289-300.
34. Poulin JF, Chevalier B, Laforest S, Drolet G. Enkephalinergic afferents of the centromedial amygdala in the rat. *J Comp Neurol* 2006;496:859-76.
35. Bedont JL, LeGates TA, Slat EA, et al. Lhx1 controls terminal differentiation and circadian function of the suprachiasmatic nucleus. *Cell Rep* 2014;7:609-22.
36. Dijk DJ, Shanahan TL, Duffy JF, Ronda JM, Czeisler CA. Variation of electroencephalographic activity during non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep with phase of circadian melatonin rhythm in humans. *J Physiol* 1997;505:851-8.
37. Massart R, Freyburger M, Suderman M, et al. The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. *Transl Psychiatry* 2014;4:e347.
38. Murray B, Antonyuk SV, Marina A, et al. Structure and function study of the complex that synthesizes S-adenosylmethionine. *IUCrJ* 2014;1:240-9.
39. Chen C, Hardy M, Zhang J, LaHoste GJ, Bazan NG. Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:435-40.
40. Dijk DJ, Czeisler CA. Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *J Neurosci* 1995;15:3526-38.
41. Hu WP, Li JD, Colwell CS, Zhou QY. Decreased REM sleep and altered circadian sleep regulation in mice lacking vasoactive intestinal polypeptide. *Sleep* 2011;34:49-56.
42. Shen H, Watanabe M, Tomasiewicz H, Rutishauser U, Magnuson T, Glass JD. Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J Neurosci* 1997;17:5221-9.
43. Willi R, Winter C, Wieske F, Kempf A, Yee BK, Schwab ME, Singer P. Loss of EphA4 impairs short-term spatial recognition memory performance and locomotor habituation. *Genes Brain Behav* 2012;11:1020-31.
44. Smith C, Rose GM. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 1996;59:93-7.
45. Luo J, Phan TX, Yang Y, Garelick MG, Storm DR. Increases in cAMP, MAPK activity, and CREB phosphorylation during REM sleep: implications for REM sleep and memory consolidation. *J Neurosci* 2013;33:6460-8.
46. Fuentemilla L, Miró J, Ripollés P, et al. Hippocampus-dependent strengthening of targeted memories via reactivation during sleep in humans. *Curr Biol* 2013;23:1769-75.
47. Fogel SM, Albouy G, Vien C, et al. fMRI and sleep correlates of the age-related impairment in motor memory consolidation. *Hum Brain Mapp* 2014;35:3625-45.

48. Terao A, Wisor JP, Peyron C, Apte-Deshpande A, Wurts SW, Edgar DM, Kilduff TS. Gene expression in the rat brain during sleep deprivation and recovery sleep: an Affymetrix GeneChip study. *Neuroscience* 2006;137:593-605.
49. Thompson CL, Wisor JP, Lee CK, et al. Molecular and anatomical signatures of sleep deprivation in the mouse brain. *Front Neurosci* 2010;4:165.
50. Igarashi K, Katoh Y. Metabolic aspects of epigenome: coupling of S-adenosylmethionine synthesis and gene regulation on chromatin by SAMIT module. *Subcell Biochem* 2013;61:105-118.
51. Kiyohara YB, Nishii K, Ukai-Tadenuma M, Ueda HR, Uchiyama Y, Yagita K. Detection of a circadian enhancer in the mDbp promoter using prokaryotic transposon vector-based strategy. *Nucleic Acids Res* 2008;36(4):e23.
52. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998;280:1564-9.
53. Raghavan AV, Horowitz JM, Fuller CA. Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. *Brain Res* 1999;833:311-4.
54. Zhuang Z, Yang B, Theus MH, Sick JT, Bethea JR, Sick TJ, Liebl DJ. EphrinBs regulate D-serine synthesis and release in astrocytes. *J Neurosci* 2010;30:16015-24.
55. Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 2008;88:983-1008.
56. Puschmann TB, Turnley AM. Eph receptor tyrosine kinases regulate astrocyte cytoskeletal rearrangement and focal adhesion formation. *J Neurochem* 2010;113:881-94.
57. North HA, Zhao X, Kolk SM, Clifford MA, Ziskind DM, Donoghue MJ. Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Development* 2009;136:2467-76.
58. North HA, Karim A, Jacquin MF, Donoghue MJ. EphA4 is necessary for spatially selective peripheral somatosensory topography. *Dev Dyn* 2010;239:630-8.
59. Wegmeyer H, Egea J, Rabe N, et al. EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. *Neuron* 2007;55:756-67.
60. Luppi PH, Clément O, Sapin E, et al. The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev* 2011;15:153-63.
61. Williams C, Mehrian Shai R, Wu Y, et al. Transcriptome analysis of synaptoneurosomes identifies neuroplasticity genes overexpressed in incipient Alzheimer's disease. *PLoS One* 2009;4:e4936.
62. Fu AK, Hung KW, Huang H, et al. Blockade of EphA4 signaling ameliorates hippocampal synaptic dysfunctions in mouse models of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:9959-64.

63. Vargas LM, Leal N, Estrada LD, et al. EphA4 activation of c-Abl mediates synaptic loss and LTP blockade caused by amyloid-beta oligomers. *PLoS One* 2014;9:e92309.
64. Musiek ES, Xiong DD, Holtzman DM. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Exp Mol Med* 2015;47:e148.

Figure 1:

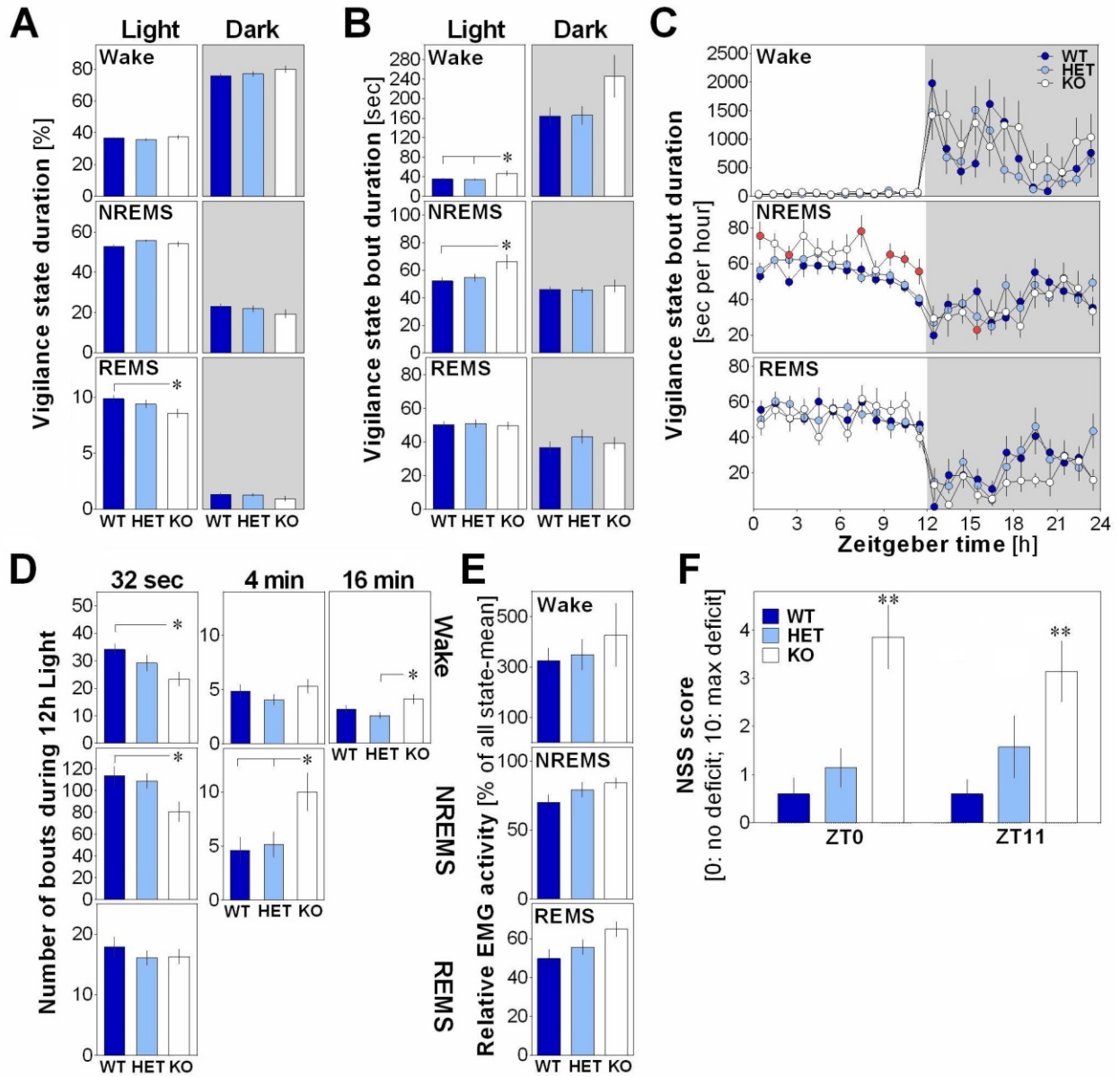


Figure 2:

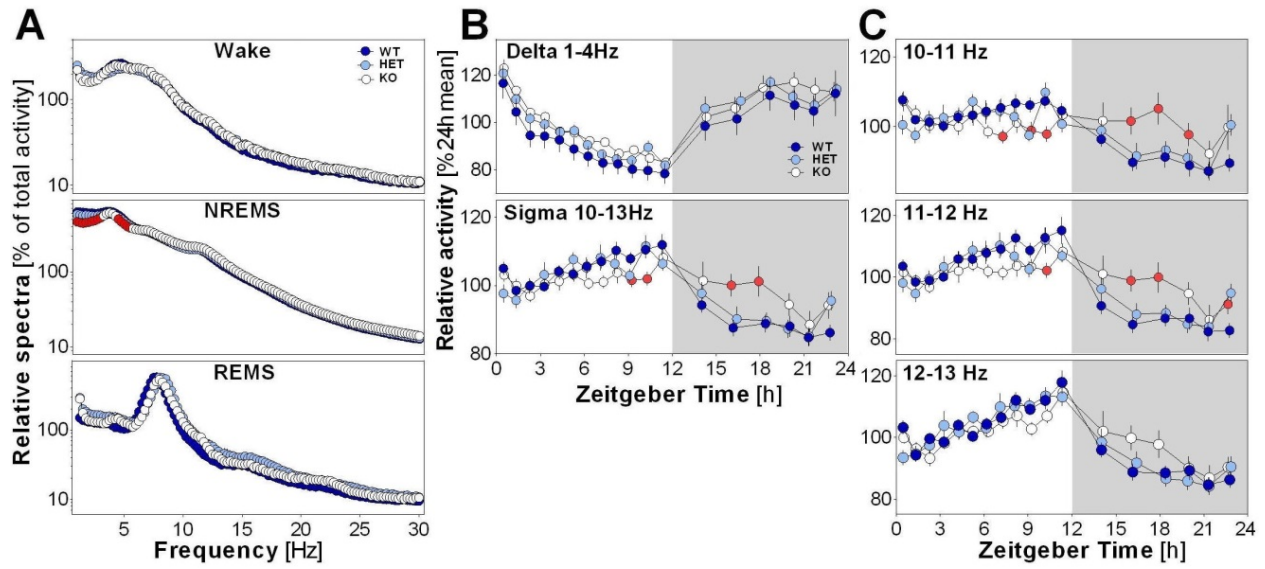


Figure 3:

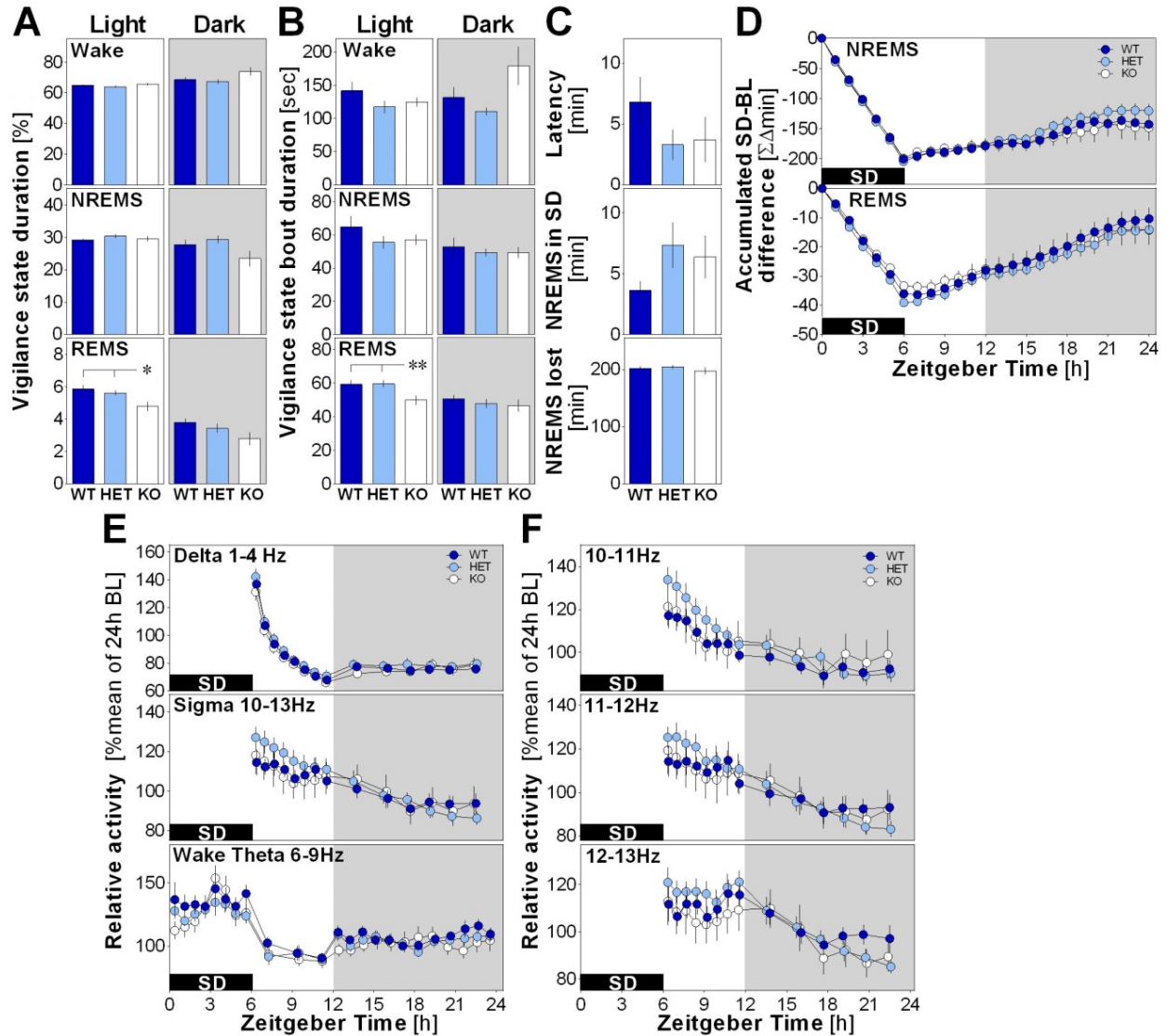


Figure 4:

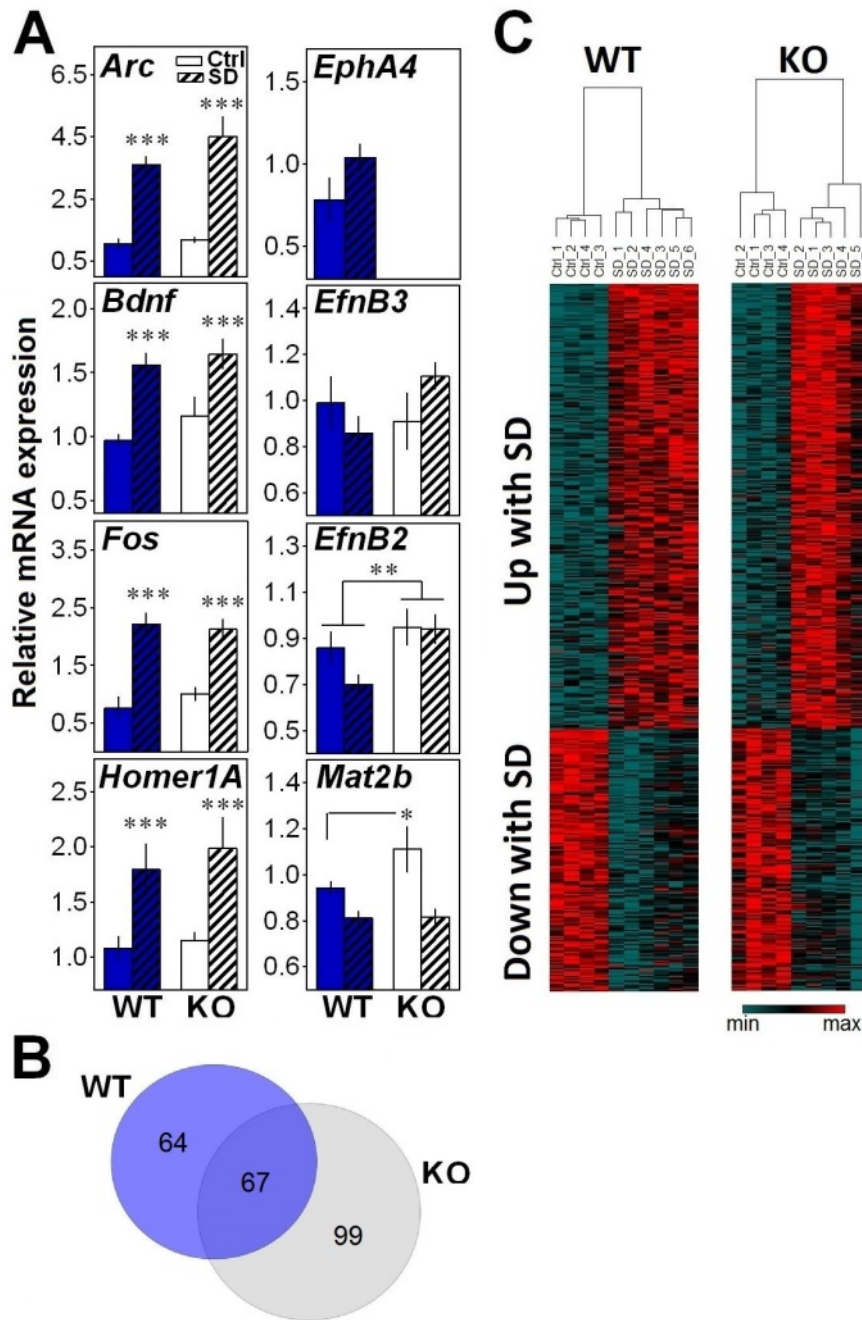


Figure 5:

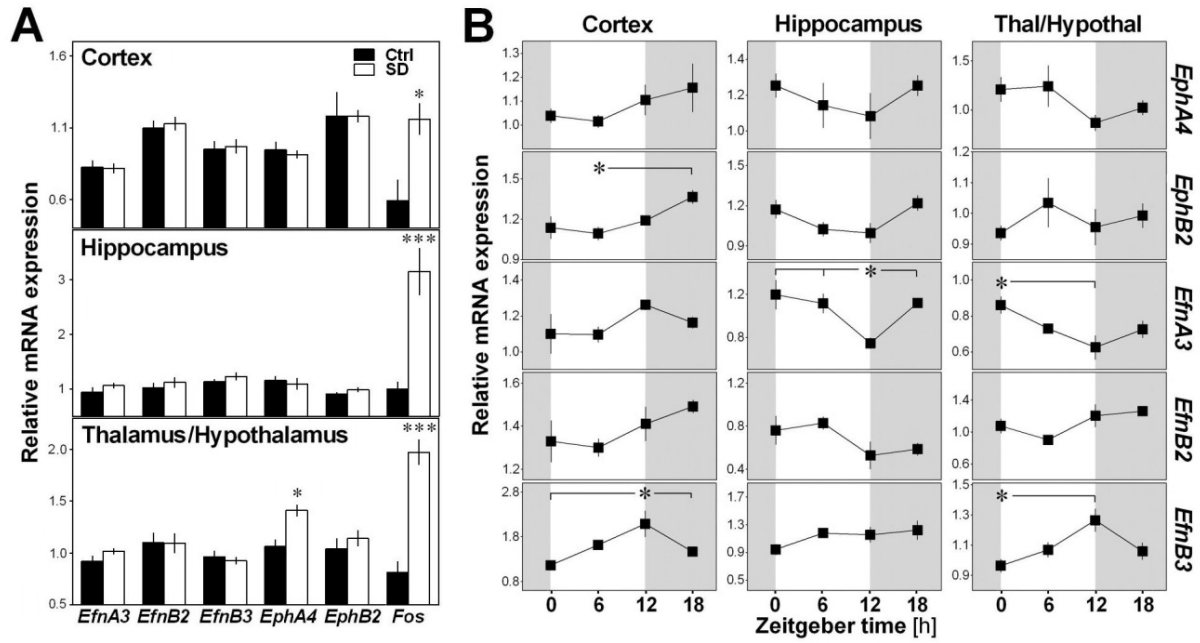


Figure 6:

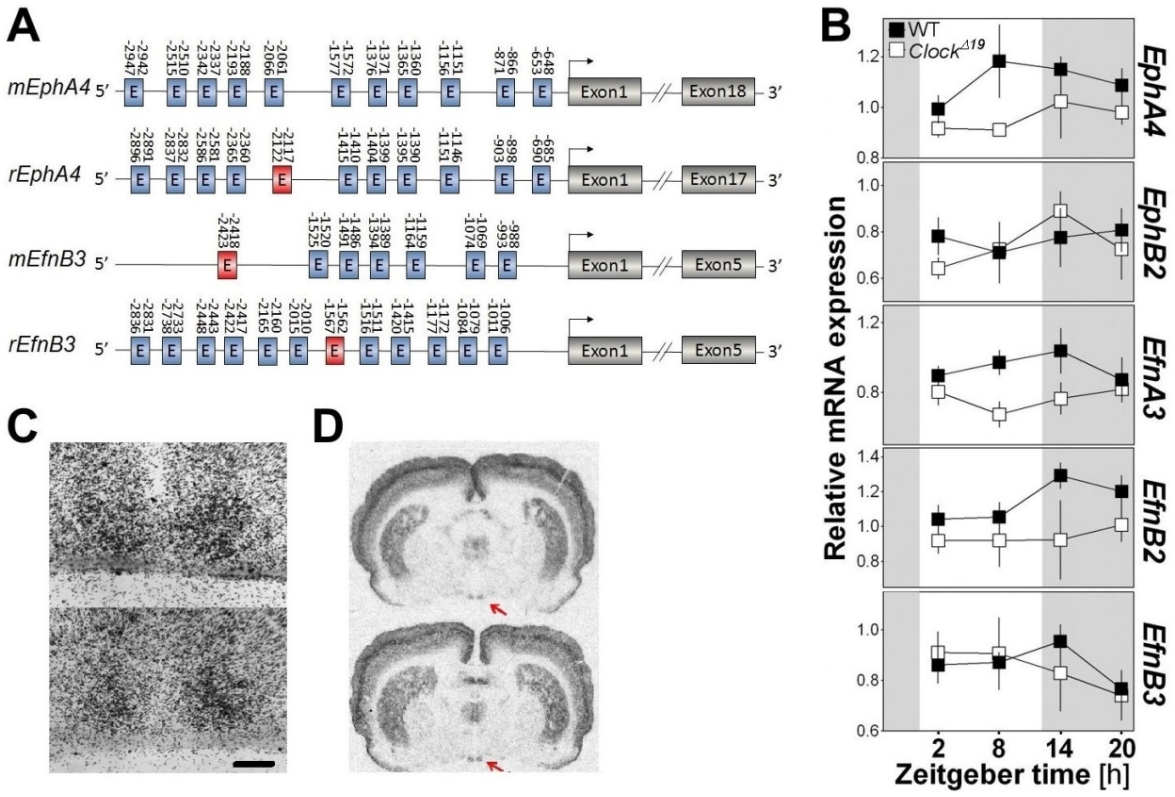
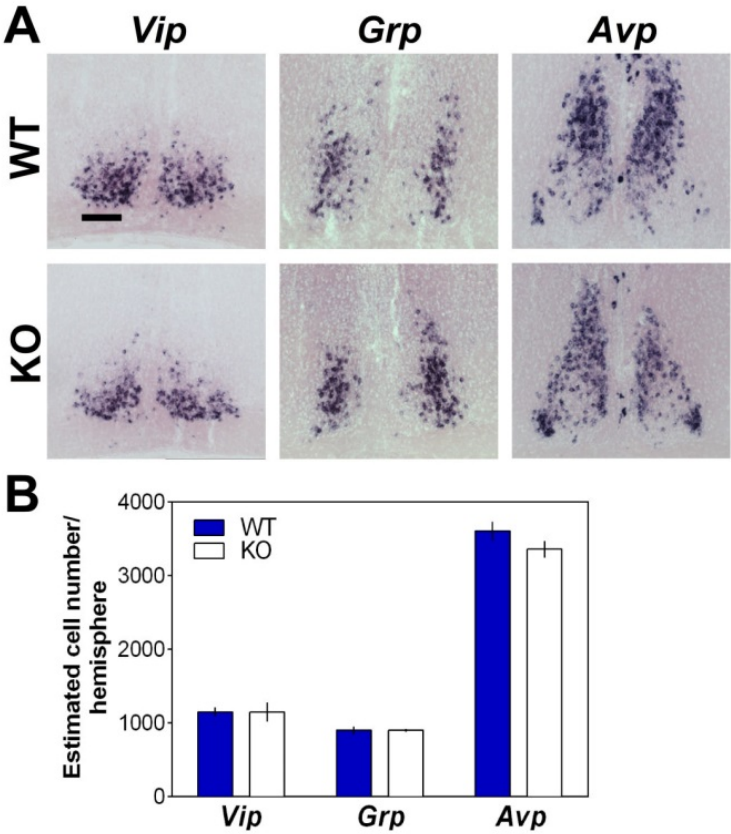


Figure 7:



TABLE

Table 1 - Sequences of primers or probes and product numbers of probe sets used for qPCR.

Gene name	Direction	Life Technologies reference number or Sequence 5' to 3'	GenBank accession number
<i>Arc</i>		Mm00479619_g1	NM_018790.3
<i>Bdnf</i>		Mm04230607_s1	NM_007540.4
<i>EphA4</i>		Mm00433056_m1	NM_007936.3
<i>EphB2</i>		Mm01181021_m1	NM_010142.3
<i>EfnA3</i>		Mm01212723_g1	NM_010108.1
<i>EfnB2</i>		Mm01215897_m1	NM_010111.5
<i>EfnB3</i>		Mm00433016_m1	NM_007911.5
<i>Fos</i>		Mm00487425_m1	NM_010234.2
<i>Homer1A</i>	fwd rev prob	GCATTGCCATTTCCACATAGG ATGAACTTCCATATTTATCCACCTTACTT ACACATTCAATTCAGCAATCATGA	NM_011982
<i>Mat2b</i>		Mm00506137_m1	NM_001199274.1
<i>Actin</i>	fwd rev prob	CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT CACAGCCTGGATGGCTACGT TTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG	NM_007393
<i>GusB</i>	fwd rev prob	ACGGGATTGTGGTCATCGA TGACTCGTTGCCAAAACCTCTGA AGTGTCCCGGTGTGGGCATTGTG	NM_010368
<i>Rps9</i>	fwd rev prob	GACCAGGAGCTAAAGTTGATTGGA TCTTGCCAGGGTAAACTTGA AAACCTCACGTTTGTTCGGAGTCCATACT	NM_029767
<i>Tbp</i>	fwd rev prob	TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC TTCTCATGATGACTGCAGCAAA TGCAAGAAATGCTGAATATAATCCCAAGCG	NM_013684

Chapitre 4 - Discussion Générale

Nous avons présenté deux études visant à mieux comprendre et définir le rôle de deux molécules d'adhésion cellulaire dans la régulation du sommeil. *Nlgn1* semble avoir un rôle dans le processus homéostatique de la régulation du sommeil alors que le récepteur EphA4 serait impliqué dans la régulation circadienne du sommeil. Ainsi, nous avons pu voir que la contribution de ces deux molécules d'adhésion cellulaire dans la régulation du sommeil est différente. Dans cette discussion générale, les résultats de recherche obtenus vont être résumés puis l'effet de *Nlgn1* sur les ondes lentes sera discuté, ensuite nous traiterons de l'analyse des microarray dans les deux modèles murins. Après, le rôle des modifications épigénétiques dans le sommeil sera abordé, suivi de l'effet du récepteur EphA4 dans le sommeil et la plasticité synaptique. Par la suite, le rôle potentiel d'EphA4 dans la régulation du sommeil sera discuté à travers l'implication des neurones à VIP dans le sommeil ainsi qu'à travers l'implication des astrocytes. Et pour finir, nous verrons certaines limitations de mon projet de recherche et enfin, la conclusion.

4.1. Résumé des résultats de recherche

4.1.1. Rôle de *Nlgn1* dans la régulation du sommeil

Dans cette première étude, nous avons pu confirmer l'implication de *Nlgn1* dans la régulation du sommeil et plus particulièrement son rôle déterminant dans le processus homéostatique de la régulation du sommeil. D'autre part, nous avons mis en lumière l'impact de la privation de sommeil sur les marques épigénétiques telles que la méthylation (5mC) et l'hydroxyméthylation (5hmC) au niveau d'éléments intervenant potentiellement dans la régulation du sommeil dans le cortex cérébral.

Faisant suite à l'article de El Helou et collaborateurs (El Helou et al., 2013) auquel j'ai contribué, nous avons confirmé que l'activité EEG dans les basses fréquences des souris *Nlgn1*^{-/-} était augmentée après une privation de sommeil de 6h en comparaison à des souris *Nlgn1*^{+/+}. Afin d'explorer plus en profondeur ce qu'il se passe au niveau de la synchronie corticale, nous

avons étudié les caractéristiques des ondes lentes chez des souris KO pour *Nlgn1*. Cette étude complémentaire a permis de révéler tout d'abord que les souris *Nlgn1*^{-/-} avaient plus d'ondes lentes avec une amplitude plus grande en comparaison des souris *Nlgn1*^{+/+} et *Nlgn1*^{+/-}. Nous avons montré que spécifiquement pendant la période de repos, les souris *Nlgn1*^{-/-} présentent une augmentation de la pente des ondes lentes après privation de sommeil tout comme les souris *Nlgn1*^{+/-}. Ainsi, l'analyse des ondes lentes des souris *Nlgn1*^{-/-} a indiqué que ces souris avaient une amplitude et une pente des ondes lentes plus importante ; ceci suggère que l'absence de *Nlgn1* amplifie la réponse électrophysiologique à la privation de sommeil au niveau de la synchronie corticale. Ainsi, *Nlgn1* agirait comme un « frein » sur la synchronie corticale. Or, ce phénotype de l'activité EEG observée dans les souris *Nlgn1*^{-/-} ne semble pas lié à des changements importants au niveau du transcriptome. En effet, dans les cerveaux de souris *Nlgn1*^{-/-}, l'étude de l'expression génique après privation de sommeil par microarray n'a pas révélé de changements importants par rapport à des souris *Nlgn1*^{+/+}. Néanmoins, le microarray et la validation des résultats obtenus par microarray ont permis de révéler des changements dans l'expression d'enzyme liée à la méthylation de l'ADN et ceci nous a encouragé à explorer l'effet de la privation de sommeil sur les marques épigénétiques (nous en discuterons de manière plus détaillée dans la **section 4.3.**) Ainsi, dans cette même étude, nous avons été les premiers à montrer qu'une privation de sommeil de 6h avait un effet sur la distribution des modifications épigénétiques comme la méthylation et l'hydroxyméthylation sur le génome notamment au niveau de gènes impliqués dans la plasticité synaptique dans le cortex cérébral. Concernant la méthylation de l'ADN, nous avons observés 227 sites génomiques différenciellement méthylés avec un enrichissement de la méthylation au niveau de gènes impliqués par exemple dans la croissance des neurites et la plasticité synaptique comme *Dlg4* qui encode la protéine PSD-95 et *Wnt5a* qui module la transmission synaptique (Munoz et al., 2014). En ce qui concerne l'hydroxyméthylation, nous avons trouvé plus de 4000 gènes qui étaient différenciellement hydroxyméthylés et l'analyse des gènes montre un enrichissement des gènes impliqués notamment dans l'organisation du cytosquelette (*Actb* et *Cntn-2, -4*) ou encore dans la neurotransmission (*Nrxn1-3* et *Nlgn3*). Ces changements épigénétiques pourraient être une première réponse de l'organisme à la suite d'une privation de sommeil.

4.1.2. Implication du récepteur EphA4 dans le processus circadien

Dans ce deuxième article, nous avons évalué le rôle du récepteur EphA4 et des éphrines dans la régulation du sommeil. Tout d'abord, nous avons analysé l'architecture du sommeil et l'activité EEG des souris *EphA4*^{-/-}. Cette première analyse a montré que pendant la période de repos, les souris n'exprimant pas EphA4 présentaient moins de SP (REMS) que les souris sauvages et des durées d'épisode individuel d'éveil et de SOL (NREMS) plus longues. Les souris *EphA4*^{-/-} ont également un nombre d'épisode court d'éveil et de SOL moins important que les souris *EphA4*^{+/+} alors que le nombre d'épisodes de longue durée, 4min et 16min pour l'éveil, et 4min pour le SOL, est plus élevé par rapport aux souris *EphA4*^{+/+}. Ceci suggère que les souris *EphA4*^{-/-} ont une consolidation entre les états de vigilance plus forte que les souris sauvages. Parallèlement, afin de vérifier que les changements observés dans l'architecture du sommeil ne résultaient pas d'une altération du tonus musculaire, nous avons étudié l'activité EMG des souris *EphA4*^{-/-}. L'activité EMG n'est pas différente entre les génotypes, ce qui suggère que l'absence d'EphA4 n'affecte pas le tonus musculaire. Par contre, l'étude des fonctions neurologiques des souris *EphA4*^{-/-} grâce au NSS (« neurological severity score ») qui est un test comportemental en 10 points et qui permet l'évaluation des fonctions motrices, du comportement physiologique et de l'attention, montre de forts déficits neurologiques chez ces souris par rapport aux souris *EphA4*^{+/+}. Cette observation peut être principalement due aux troubles locomoteurs des souris *EphA4*^{-/-} qui ont déjà été répertoriés dans des études précédentes (Dottori et al., 1998). D'autres tests comportementaux pourraient être menés pour évaluer les capacités cognitives des souris mutantes pour EphA4.

Les observations faites au niveau de la macrostructure des états de vigilance sont accompagnées par une atténuation de la rythmicité de l'activité sigma au cours de la journée. Par contre, au niveau de l'activité delta, marqueur de l'homéostasie du sommeil, aucune différence entre les trois génotypes n'a été observée. Globalement, après une privation de sommeil de 6h, les souris n'exprimant pas le récepteur EphA4 présentent une réponse électrophysiologique et moléculaire similaire aux souris sauvages. Mais de manière intéressante, les souris *EphA4*^{-/-} présentent une différence dans l'expression de *Mat2b* en

condition contrôle, qui est une enzyme régulant les modifications épigénétiques, dont l'expression est plus élevée chez les souris *EphA4*^{-/-} que les souris *EphA4*^{+/+}.

Nous avons également étudié l'effet de la privation de sommeil ainsi que le temps du jour sur l'expression du récepteur EphA4 ainsi que sur ces partenaires chez des souris C57BL/6J. Nous avons constaté qu'une privation de sommeil de 6h augmente l'expression d'*EphA4* dans la région thalamique-hypothalamique, mais également que l'expression de certains partenaires d'EphA4 était sensible au temps du jour dans le cortex, l'hippocampe ou encore la région thalamique-hypothalamique du cerveau. De plus, nous avons trouvé dans les régions promotrices d'*EphA4* et d'un de ses ligands principaux, éphrine-B3, la présence de séquences spécifiques de l'ADN sur lesquelles se lient les gènes de l'horloge, les « E-boxes ». Par ailleurs, l'expression d'*EphA4* et de certains partenaires est diminuée dans le cerveau de souris mutantes pour le gène *Clock*. Tous ces résultats suggèrent que le récepteur EphA4 serait impliqué dans la régulation circadienne du sommeil.

4.2. Caractéristiques des ondes lentes chez les souris *Nlgn1*^{-/-}

Les ondes lentes sont des marqueurs de l'homéostasie du sommeil et nous permettent de mieux comprendre les mécanismes relatifs à la synchronie corticale ayant lieu pendant le sommeil (Molle et al., 2006; Esser et al., 2007; Vyazovskiy et al., 2009). L'analyse des caractéristiques des ondes lentes pendant le SOL chez les souris *Nlgn1*^{-/-} a révélé des ondes lentes avec une amplitude plus importante ainsi qu'une pente des ondes lentes plus forte que les souris *Nlgn1*^{+/+}. Il a été proposé que la force synaptique serait représentée par la hauteur de l'amplitude des ondes lentes ainsi que par leur pente, et que la pente d'une onde lente est également associée à une synchronie corticale (Tononi and Cirelli, 2006; Esser et al., 2007). En effet, la pente représente la synchronisation des neurones qui passent en même temps d'un état silencieux, appelé période OFF, à un état de dépolarisation, appelé période ON (Steriade et al., 1993b). Nos observations suggèrent que les souris *Nlgn1*^{-/-} ont une plus forte synchronie corticale dans l'activité delta pendant le SOL, notamment après une privation de sommeil. Ainsi, nos résultats confirment notre hypothèse de départ qui était que les souris *Nlgn1*^{-/-} ont une pente des ondes lentes plus élevée que les souris sauvages. Nos observations montrent que

pendant le SOL, l'absence de *Nlgn1* induit une synchronie corticale plus élevée spécifiquement dans l'activité delta après une privation de sommeil. Le sommeil des souris *Nlgn1*^{-/-} est plus intense que le sommeil des souris *Nlgn1*^{+/+}. Avec un sommeil plus intense, nous pourrions penser que ces souris possèdent un sommeil récupérateur plus fort. Paradoxalement à cette observation, nous avons montré précédemment que les souris *Nlgn1*^{-/-} présentaient des déficits dans la durée et la qualité de l'éveil ainsi que de la difficulté à maintenir l'éveil associé avec un rebond dans l'activité delta après privation de sommeil qui étaient plus importants que chez les souris *Nlgn1*^{+/+} (El Helou et al., 2013). Ce paradoxe montre que contrairement à ce que nous pourrions penser, la forte synchronie corticale dans l'activité delta pendant le SOL observée chez les souris *Nlgn1*^{-/-} après privation de sommeil ne traduit pas un sommeil plus récupérateur. De plus, à l'éveil les souris *Nlgn1*^{-/-} présentent une diminution de l'activité delta élevée (3.25-4 Hz), thêta et alpha (El Helou et al., 2013). Par ailleurs, les souris *Nlgn1*^{-/-} présentent des déficits cognitifs au niveau de la mémoire spatiale, la mémoire de peur conditionnée ou encore dans les interactions sociales (Kim et al., 2008; Blundell et al., 2010; El Helou et al., 2013). Une dysfonction de *Nlgn1* a également été associée aux troubles autistiques (pour revue Sudhof, 2008).

Comment explique-t-on qu'une plus forte synchronie corticale dans l'activité delta durant le sommeil puisse être associée, pendant l'éveil, à une diminution dans l'activité delta élevée, thêta et alpha, ainsi qu'à des troubles cognitifs importants ? Les observations faites sur les caractéristiques des ondes lentes pourraient potentiellement être expliquées par le rôle de *NLGN1* dans régulation de l'activité des récepteurs NMDA. En effet, l'absence de *Nlgn1* diminue la transmission glutamatergique dépendante des récepteurs NMDA et donc affecte le ratio NMDA/AMPA aux synapses excitatrices (Chubykin et al., 2007). Or, l'activité des récepteurs NMDA, de par sa dynamique lente, est favorable à une désynchronie corticale comme celle observable durant l'éveil (Harsch and Robinson, 2000; Golomb et al., 2006). De plus, la contribution relative des récepteurs NMDA et AMPA détermine le degré de synchronie entre les neurones (Harsch and Robinson, 2000; Golomb et al., 2006). Par ailleurs, la privation de sommeil diminue la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA ainsi que

l'expression des récepteurs NMDA à la membrane post-synaptique (Kopp et al., 2006; McDermott et al., 2006). Ces données suggèrent que la contribution des récepteurs NMDA pourrait diminuer au cours de l'éveil alors que durant le sommeil, leur activité augmenterait progressivement, ce qui réduirait la synchronie corticale. (Chubykin et al., 2007)

L'absence de *Nlgn1* diminue les courants excitateurs dépendants des récepteurs NMDA (Chubykin et al., 2007) affectant ainsi l'activité des récepteurs NMDA, et il a été rapporté que cette diminution des courants dépendants des récepteurs NMDA pouvait s'expliquer par un changement dans l'activité de la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA (Espinosa et al., 2015). La fonctionnalité des récepteurs NMDA est modifiée en fonction des sous-unités qui composent le récepteur. De plus, il a été montré que *Nlgn1* peut interagir indirectement (via PSD95) (Irie et al., 1997; Barrow et al., 2009) ou directement (Budreck et al., 2013) avec les récepteurs NMDA et ces interactions sont importantes dans la stabilisation et le regroupement des récepteurs NMDA à la membrane post-synaptique. En affectant la composition des récepteurs NMDA ainsi que le regroupement et la stabilisation des récepteurs NMDA à la synapse, l'absence de *Nlgn1* perturbe l'activité des récepteurs NMDA et donc leur rôle relatif à la désynchronie serait diminué aboutissant à une qualité d'éveil amoindrie et à une synchronie corticale dans l'activité delta pendant SOL plus élevée comme nous l'observons au niveau de la pente des ondes lentes. Ainsi, chez les souris *Nlgn1*^{-/-}, l'absence de *Nlgn1* pourrait altérer les propriétés des synapses excitatrices, en diminuant l'activité des récepteurs NMDA, et donc la désynchronie corticale, qui est caractéristique de l'éveil, pourrait être moins efficace. Tous ces événements mènent vers une synchronie corticale plus importante en l'absence de *Nlgn1*, qui s'illustrerait par une pente des ondes lentes plus élevée pendant le SOL. Nos observations suggèrent que *Nlgn1* est impliquée dans la régulation de la pente des ondes lentes en agissant comme un « frein » sur la pente, qui est plus grande en son absence.

De plus, nos résultats indiquent également que la privation de sommeil diminue l'expression de différents transcrits de *Nlgn1* qui possèdent des fonctions distinctes en fonction de l'insert qu'ils contiennent. Donc le rôle de *Nlgn1* pourrait être différent en fonction de la

durée de l'éveil et du sommeil car la privation de sommeil affecte l'expression de différents transcrits de *Nlgn1* ayant des inserts différents dans *Nlgn1*. En effet, nous avons montré que l'expression de *Nlgn1* contenant l'insert B était significativement augmentée à 6h après l'ouverture des lumières (ZT6) en comparaison aux autres temps du jour (El Helou et al., 2013). Ceci suggère un contrôle de l'expression de certains transcrits de *Nlgn1* par les facteurs de transcription de l'horloge biologique. Des observations complémentaires ont permis de confirmer que la liaison entre BMAL1 et CLOCK au niveau d'une « E-Box » située la région promotrice de *Nlgn1* était augmentée à ZT6 (El Helou et al., 2013). En conclusion, ces observations suggèrent un rôle de la machinerie moléculaire de l'horloge dans la transmission glutamatergique en régulant l'expression de *Nlgn1*.

Au niveau protéique, nous avons montré que l'expression de NLGN1 est diminuée dans la partie antérieure du cerveau de souris C57BL/6J après privation de sommeil (El Helou et al., 2013). Un des mécanismes par lequel la privation de sommeil peut induire une diminution de l'expression protéique de NLGN1 est via la voie mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin »). Cette voie fait intervenir deux protéines kinases, mTORC1 et mTORC2, qui participent à l'initiation de la traduction. Une augmentation de la phosphorylation de mTor induit une augmentation de la traduction (pour revue Wullschleger et al., 2006; Costa-Mattioli and Sonenberg, 2008). mTOR agit sur la traduction en régulant le complexe d'initiation de la traduction eIF4F (pour revue Hay and Sonenberg, 2004; Costa-Mattioli and Sonenberg, 2008). En effet, mTOR phosphoryle les protéines 4E-BPs ce qui permet l'initiation de la traduction (Pause et al., 1994). Les protéines 4E-BPs inhibent l'initiation de la traduction en perturbant la formation du complexe eIF4F (Pause et al., 1994). La transcription de mTOR est diminuée dans l'hippocampe après une privation de sommeil de 5h, ainsi que son expression protéique et la forme phosphorylée et active de mTOR (Vecsey et al., 2012). Les mêmes auteurs ont montré que l'expression génique de la majorité des éléments qui composent la machinerie de traduction étaient diminuée par la privation de sommeil (par exemple : eIF2a, eIF3s6ip, eIF4eI3, eIF5; Vecsey et al., 2012). Ces résultats suggèrent que cette voie de régulation de la traduction est fortement affectée après une privation de sommeil et pourrait expliquer les effets délétères du manque de sommeil sur la mémoire (pour revue Costa-Mattioli and Sonenberg,

2008; Hoeffler and Klann, 2010). Bien que le rôle de la voie de mTOR sur la plasticité synaptique lors du sommeil ait été décrit (Seibt et al., 2012), les changements au niveau de la voie mTOR qui pourraient modifier l'activité EEG ne semblent pas encore caractérisés. Une étude a montré que des souris n'exprimant pas *eIF4ebp2*, qui est le gène encodant pour la protéine 4E-BP2, présentaient une traduction de *Nlgn1* augmentée, une augmentation de la transmission excitatrice par rapport aux transmissions inhibitrices, et présentaient des troubles de type autistique (Gkogkas et al., 2013). La diminution de l'expression de *Nlgn1* dans ces souris mutantes pour *eIF4ebp2* rétablissait le ratio synapses excitatrices/inhibitrices ainsi que les troubles autistiques observés (Gkogkas et al., 2013). Ainsi, le complexe de traduction eIF4F semble réguler la synthèse de NLGN1. Ces observations suggèrent que la privation de sommeil puisse altérer la traduction de molécules d'adhésion cellulaire telles que Nlgn1 via la voie mTOR. La privation de sommeil induirait une diminution de mTOR (Vecsey et al., 2012) ce qui diminuerait la traduction de *Nlgn1* et perturberait le ratio NMDA/AMPA ainsi que l'équilibre entre la transmission excitatrice et inhibitrice.

L'équilibre entre la transmission excitatrice et inhibitrice réfère à la contribution relative des synapses excitatrices et inhibitrice sur les événements neuronaux et notamment la génération des ondes lentes. En effet, il a été proposé que les interneurons corticaux inhibiteurs pouvaient jouer un rôle important dans la synchronie neuronale (Buzsaki and Chrobak, 1995). Une étude a montré que la synchronie observée au début de la phase silencieuse des ondes lentes serait due à l'activité d'interneurones inhibiteurs (Chen, J.Y. et al., 2012). En effet, lors de l'application d'agoniste GABAergique, les auteurs ont observé une synchronie plus grande entre la période ON et OFF. Il a été proposé que la transmission inhibitrice synchroniserait les neurones permettant l'initiation synchrone des périodes OFF (Chen, J.Y. et al., 2012). Ces observations sont soutenues par une étude qui a montré qu'une activité importante des interneurons inhibiteurs était observée lors de la fin de la période de dépolarisation ou période ON, ce qui allait provoquer une réaction en chaîne afin de synchroniser les neurones dans leur phase OFF (Lemieux et al., 2015). Ces données suggèrent que l'équilibre entre la transmission excitatrice et inhibitrice régule l'activité des ondes lentes.

Un des mécanismes par lequel Nlgn1 pourrait agir sur les paramètres des ondes lentes, comme la pente des ondes lentes, serait en altérant l'équilibre entre la transmission excitatrice et inhibitrice. En effet, une étude récente suggère un rôle important de Nlgn1 dans l'équilibre de la transmission excitatrice et inhibitrice (Jedlicka et al., 2015). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'une délétion de *Nlgn1* diminuait la transmission excitatrice dans le gyrus dentelé de l'hippocampe via la voie perforante. Mais cette diminution de la transmission synaptique excitatrice est compensée dans les cellules granulaires par une excitabilité qui devient plus importante. De plus, les auteurs ont observé dans cette étude que l'inhibition des cellules granulaires par les interneurones est diminuée. Ainsi, l'équilibre entre la transmission excitatrice et inhibitrice tend vers la transmission excitatrice dans le gyrus dentelé, et particulièrement dans les cellules granulaires. Ces données suggèrent que l'absence de *Nlgn1* tend à augmenter la transmission excitatrice ce qui pourrait expliquer pourquoi nous observons une augmentation de la pente des ondes chez les souris mutantes pour *Nlgn1*.

4.3. Analyse du transcriptome des souris *Nlgn1*^{-/-} et *EphA4*^{-/-} par puce à ADN

Etant donné les changements importants dans l'activité EEG chez les souris *Nlgn1*^{-/-}, nous nous attendions à ce que l'expression des gènes après privation de sommeil soit modifiée. Or, malgré des différences notables dans les réponses électrophysiologiques à la suite d'une privation de sommeil chez les souris *Nlgn1*^{-/-}, l'étude par microarray de la réponse moléculaire à la privation de sommeil dans le cerveau des souris n'exprimant pas *Nlgn1* n'a pas révélé de changements majeurs dans l'expression des gènes. Il en est de même pour les souris *EphA4*^{-/-}, l'étude par microarray n'ayant pas révélé de changements majeurs dans l'expression des gènes en condition de base ou après privation de sommeil. Néanmoins, nos deux études par microarray ont confirmé les résultats obtenus dans des études précédentes sur les changements dans l'expression des gènes induits par une privation de sommeil (Maret et al., 2007; Mackiewicz et al., 2009; Mongrain et al., 2010). En effet, en combinant les deux génotypes, les souris *Nlgn1*^{-/-} et *Nlgn1*^{+/+}, nous avons montré que 1298 transcrits étaient significativement

affectés par la privation de sommeil (Massart et al., 2014). Dans notre deuxième article dans lequel nous avons étudié l'effet de la privation de sommeil chez des souris n'exprimant pas le récepteur EphA4, nous avons dénombré seulement 457 transcrits qui étaient modifiés avec la privation de sommeil. Ce faible nombre est probablement dû au faible nombre d'animaux utilisé pour cette étude ; soit 4 souris sauvages en condition contrôle contre 6 souris sauvages en condition privation de sommeil et de 4 souris KO en condition contrôle et de 5 en condition privation de sommeil. À titre de comparaison dans notre première étude nous avons 6 animaux dans chaque condition et pour chaque génotype. Cet échantillonnage plus faible a pu diminuer la puissance de l'analyse par microarray. Néanmoins, les gènes identifiés dans notre étude sont globalement associés à des fonctions neurobiologiques connues comme étant modifiées par la privation de sommeil telles que l'organisation du cytosquelette, les rythmes circadiens et la plasticité synaptique (Mongrain et al., 2010; Massart et al., 2014). Les résultats des analyses par microarray suggèrent donc que *Nlgn1* et *EphA4* agiraient en aval des mécanismes qui induisent des changements transcriptionnels associés à un éveil prolongé, et seraient peut-être une sortie des événements transcriptionnels qui ont lieu pendant les processus de régulation du sommeil.

Nos études avec des souris KO constitutives peuvent laisser penser qu'une compensation développementale ait eu lieu par un autre membre de la famille des NLGNs ou des récepteurs Eph. Or les microarray pour les deux études ne nous montrent aucune compensation de l'expression de l'ARNm d'un des membres de la famille des NLGNs ou des récepteurs Eph ni de leurs ligands, les éphrines. De plus, Murai et collaborateurs, ont déjà rapporté que chez les souris *EphA4*^{-/-}, il n'y avait pas de compensation de l'absence de EphA4 par l'expression protéique d'autres récepteurs tels que EphA5 et EphB2 (Murai et al., 2003). Cependant, nous ne pouvons exclure une compensation au niveau protéique de certains ligands du récepteur EphA4 ou des NRXs pour les souris *Nlgn1*^{-/-}.

Toutefois, nous avons observé que l'expression des variants spécifiques de *Nlgn1* est diminuée dans le cortex cérébral après une privation de sommeil. Ainsi, une privation de sommeil peut favoriser ou diminuer spécifiquement l'expression de certains variants de transcription afin d'ajuster une réponse physiologique à un tel stimulus. Et ce contrôle dans l'expression de certains variants de transcription peut être régulé par des mécanismes

épigénétiques (Brown et al., 2012). Grâce à l'étude par microarray dans mon premier article, nous avons identifiés que la privation de sommeil diminuait l'expression d'enzymes favorisant la méthylation de l'ADN, les ADN méthyltransférases (DNMTs, Chen et al., 1991). Et de manière intéressante, nous avons pu voir que l'expression de *Mat2b*, une enzyme impliquée dans les processus épigénétiques, était augmentée chez les souris n'exprimant pas *EphA4* en condition normale. De plus, une étude récente a montré que l'expression des NLGNs et des NRXs était contrôlée par des mécanismes épigénétiques (Runkel et al., 2013). Ces observations nous ont amené à étudier l'effet de la privation de sommeil sur les changements des modifications épigénétiques qui peuvent favoriser par exemple la transcription d'un variant de *Nlgn1* plus qu'un autre.

4.4. Rôle des marques épigénétiques dans la régulation de la transcription

Les marques épigénétiques sont sensibles aux stimuli internes et externes de l'individu et vont modifier l'expression génique en fonction des indices environnementaux ce qui permet une adaptation du génome en réponse à l'expérience vécue (Szyf et al., 2008; Feil and Fraga, 2011; Trollope et al., 2012). (Graff et al., 2012; Cortes-Mendoza et al., 2013) Plus particulièrement, la méthylation (5mC) et l'hydroxyméthylation (5hmC) de l'ADN, sont impliquées dans le développement du cerveau (Lister et al., 2013) et répondent à l'activité neuronale (Guo et al., 2011a). Ils régulent l'expression de gènes impliqués dans la plasticité (Lubin et al., 2008; Munoz et al., 2010; Rajasethupathy et al., 2012) tel que le *Bdnf* (Lubin et al., 2008; Munoz et al., 2010). Ainsi, ce sont des régulateurs essentiels de l'essor et le maintien des changements de plasticité synaptique impliqués notamment dans l'apprentissage (Miller and Sweatt, 2007; Feng et al., 2010; Guo et al., 2011a; Graff et al., 2012; Cortes-Mendoza et al., 2013). Les événements épigénétiques peuvent être définis comme des empreintes structurelles des activités synaptiques sur le génome (Bird, 2007). Traditionnellement, les modifications épigénétiques étaient considérées comme des phénomènes moléculaires hérités et stables du génome altérant l'expression génique de manière quasi-permanente. Mais il s'avère que les changements épigénétiques sont dynamiques chez l'adulte et sensibles à l'activité neuronale

(Guo et al., 2011a). Il est bien établi que la 5mC de l'ADN au niveau du promoteur et dans les régions régulatrices de la transcription inhibe l'expression génique (McGowan and Szyf, 2010). Ces groupements méthyles ponctuent le génome et conditionnent le schéma d'expression des gènes. L'5hmC permet la déméthylation de l'ADN mais il constitue également une marque à part entière. Par ailleurs, elle est très abondante au niveau du cortex cérébral à l'âge adulte chez l'animal et chez l'humain en particulier au niveau du cortex cérébral (Munzel et al., 2010; Li and Liu, 2011). Nous allons revenir plus en détail sur l'5hmC dans la **section 4.4.2**.

4.4.1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique dans lequel les bases cytosines peuvent être modifiées par l'addition d'un groupement méthyle grâce à des enzymes, les ADN méthyltransférases (DNMTs, Chen et al., 1991). Concernant la méthylation de l'ADN, nous avons mis en évidence que la privation de sommeil modifiait 227 sites génomiques dont 150 qui avaient une méthylation diminuée alors que 79 étaient plus méthylés. Grâce à une analyse « ingenuity pathway », nous avons pu voir un enrichissement significatif de la méthylation dans les voies de la plasticité synaptique ou encore la croissance des neurites. Par exemple, la privation de sommeil augmente la méthylation des régions promotrices de *Wnt5a* et de *Dlg4* qui favorisent la transmission glutamatergique par le recrutement des récepteurs NMDA/AMPA (Farias et al., 2009; Nair et al., 2013) et de gènes associés à la fonction synaptique tels que *Rab11b* et de *Pcdh19* (Khvotchev et al., 2003; pour revue Seong et al., 2015). De plus, nous avons trouvé globalement une corrélation négative entre l'augmentation de la méthylation au niveau des promoteurs et l'expression de l'ARNm, excepté pour le gène *Dlg4* où une augmentation de la 5mC a été trouvée dans le deuxième intron et favoriserait la transcription d'un transcrit particulier de *Dlg4*, BY124098 (Massart et al., 2014). La diminution de la méthylation dans la région promotrice de gènes impliqués dans les fonctions de plasticité permettrait une augmentation de l'expression de certains gènes en réponse à la privation de sommeil. Il a été montré que l'efficacité de synapses excitatrices des neurones pyramidaux des couches II et III est augmentée pendant l'éveil et après privation de sommeil chez la souris et le

rat (Liu et al., 2010). Ainsi, par leur sensibilité à l'activité neuronale (Guo et al., 2011a), la 5mC et 5hmC peuvent être modifiées par la privation de sommeil.

Nelson et collaborateurs, suggèrent que l'augmentation de la 5mC globale de l'ADN observée dans leur étude contrôlerait la libération spontanée des vésicules présynaptiques (Nelson et al., 2008). Ils proposent également que la capacité de la 5mC de l'ADN à modifier la transmission synaptique dépendrait de l'activité synaptique elle-même, suggérant ainsi que l'état de méthylation des gènes qui jouent un rôle dans la plasticité synaptique, serait sous le contrôle de l'activité neuronale (Nelson et al., 2008). L'effet de l'activité neuronale sur la régulation de la 5mC de l'ADN pourrait impliquer la signalisation calcique dépendante des récepteurs NMDA (Nelson et al., 2008). Mais les mécanismes par lesquels l'activité neuronale module la méthylation de l'ADN restent encore flous. Nous avons montré qu'une privation de sommeil augmente l'expression de *Dnmt3a1* et *Dnmt3a2* mais nous avons également observé une diminution de *Mat2b* qui est une enzyme catalysant des réactions de donneurs de méthyle. Ces observations supportent notre hypothèse de départ qui était que la privation de sommeil allait modifier la distribution de la 5mC sur le génome afin de permettre à l'organisme de répondre de manière adéquate à ce changement environnemental.

Le rôle de la méthylation a été étudié dans les formes Hebbiennes et non-Hebbiennes de la plasticité synaptique qui sont deux types de plasticité proposés comme étant modifiés pendant le sommeil (pour revue Guzman-Karlsson et al., 2014). Au niveau de la plasticité Hebbienne, le blocage de la méthylation de l'ADN par l'utilisation d'un inhibiteur des DNMTs, le 5 aza-2-deoxycytidine ou la zébularine, diminue la LTP dans l'hippocampe (Levenson et al., 2006). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur des DNMTs diminue spécifiquement la méthylation du promoteur du *Bdnf* et de la Reelin (Levenson et al., 2006) qui sont des éléments importants dans la plasticité neuronale (Lu and Figurov, 1997; Lu, 2003; Herz and Chen, 2006; Levenson et al., 2008). De plus, une étude a montré que des souris mutantes pour *Dnmt1* et *Dnmt3a* spécifiquement dans les neurones excitateurs présentent une LTP diminuée et des déficits cognitifs (Feng et al., 2010). Au niveau de la plasticité non-Hebbienne, qui réfère à une plasticité

homéostatique incluant le neurone dans un réseau et qui permet de maintenir l'activité neuronale globale du réseau a un niveau stable (Turrigiano and Nelson, 2004), l'inhibition des DNMTs réduit l'activité neuronale via la diminution de la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs (Nelson and Turrigiano, 2008). Il a été également montré qu'une activité neuronale prolongée produisaient une augmentation de l'expression du *Bdnf* associée à une diminution du niveau de méthylation au niveau de son promoteur (Martinowich et al., 2003; Nelson et al., 2008). Le mécanisme par lequel le BDNF diminuerait l'activité excitatrice n'a pas été encore bien compris mais il a été observé que l'application de BDNF sur des neurones en culture augmenterait l'activité inhibitrice des interneurons causant ainsi une diminution de l'activité excitatrice au niveau du réseau neuronal (Rutherford et al., 1998). De manière intéressante, il a été montré qu'une privation de sommeil modifie la méthylation du *Bdnf* dans le cortex de rat (Ventskovska et al., 2015).

4.4.2. L'hydroxyméthylation de l'ADN

L'hydroxyméthylation (5hmC) de l'ADN est une modification supplémentaire de la 5mC de l'ADN qui a été suggérée comme servant d'intermédiaire à la déméthylation (He et al., 2011; Maiti and Drohat, 2011; Zhang et al., 2012) ou encore à une stabilisation des modifications épigénétiques (Szulwach et al., 2011; Wu et al., 2011). L'5hmC, qui apparaît lors du développement neuronal (Wu et al., 2011), est très abondante dans le cerveau à l'âge adulte chez l'animal et en particulier au niveau du cortex cérébral (Munzel et al., 2010; Li and Liu, 2011) suggérant ainsi un rôle dans le contrôle de la fonction neuronale. De plus, l'5hmC est particulièrement enrichie aux sites de liaisons de facteurs de transcription, des promoteurs ou encore au niveau de corps de gène activement transcrits (Stroud et al., 2011; Lister et al., 2013). Ces observations suggèrent une forte participation de 5hmC dans la régulation de l'expression génique bien que son rôle reste encore obscur.

Dans notre étude, nous avons observé que plus de 12 000 sites génomiques associés à plus de 4000 gènes, étaient différentiellement hydroxyméthylés après privation de sommeil. De manière intéressante, nous avons constaté que les sites génomiques hydroxyméthylés étaient différents des sites génomiques méthylés. En effet, nous avons trouvé un enrichissement de

l'5hmC au niveau des exons, des sites de terminaison de la transcription, mais une diminution au niveau des promoteurs. Une analyse « ingenuity pathway » nous a permis de montrer que l'enrichissement de l'5hmC se trouvait au niveau de gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette comme *Actb*, *EfnA5*, *Cntn2* ou *Cntn4*, la neurotransmission (*Nrxn1-3*, *Nlgn3*, *Reln*,...) ou encore la signalisation de protéines kinases (*Mapk2k2-4*, *Stat3*, *RhoH*,...). L'5hmC était augmentée au niveau de sites génomiques associés à des gènes liés à la fonction synaptique tels que *Nrxn1-2-3*, *Nlgn3*, *Ephx3*, *EphB2-3-4-6* ou *EphA7-8*, ce qui suggère que l'effet de l'hydroxyméthylation de l'ADN contrôlant la plasticité synaptique s'applique à des molécules d'adhésion cellulaire. Nous avons pu voir que l'absence de certaines molécules d'adhésion synaptique modifiait le sommeil. En effet l'absence de *Nlgn1* augmentait la durée du SOL ainsi que l'activité delta pendant le SOL, alors que l'absence du récepteur *EphA4* diminuait la durée du SP mais augmentait la consolidation des états de vigilance.

Une enzyme intervenant dans les mécanismes d'hydroxyméthylation de l'ADN a été identifiée comme un modulateur de la plasticité synaptique. Il s'agit de TET1 qui est un membre de la famille des enzymes « Ten-Eleven Translocation » (TETs) (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010; Guo et al., 2011b; He et al., 2011; Rudenko et al., 2013). La découverte des enzymes TETs a été une importante découverte dans le domaine de l'épigénétique car elle permet de suggérer une nouvelle voie de régulation de la méthylation de l'ADN. Cette famille est composée de 3 membres, TET1, TET2 et TET3 qui sont des enzymes catalysant l'oxydation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine et dont l'activité peut promouvoir la déméthylation de l'ADN, mais l'hydroxyméthylation est également une marque en soi (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010; Guo et al., 2011b; He et al., 2011). Le rôle biologique de cette famille d'enzyme semble suggérer une implication dans le développement (Inoue and Zhang, 2011; Inoue et al., 2011). TET1 et TET2 sont principalement retrouvés dans les cellules souches embryonnaires alors que TET3 est exprimé dans les cellules germinales (Ito et al., 2010). De manière intéressante, l'5hmC est enrichie dans le cortex cérébral chez l'humain et la souris, et l'5hmC est notamment située sur des gènes encodant pour des protéines synaptiques dans le cortex cérébral de souris (Munzel et al., 2010; Li and Liu, 2011; Khare et al., 2012). Ces données suggèrent un

rôle de l'5hmC dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la plasticité synaptique. De plus, la présence de l'5hmC sur le gène est corrélée positivement avec les niveaux d'expression des gènes (Jin et al., 2011). L'hydroxyméthylation va également jouer un rôle dans la plasticité synaptique. En effet, des souris mutantes pour *Tet1* présentent des déficits dans l'extinction de l'apprentissage ainsi que des perturbations de la LTD dans l'hippocampe (Rudenko et al., 2013). Ainsi, ces résultats montrent que les mécanismes favorisant l'hydroxyméthylation influencent la plasticité synaptique de type Hebbienne.

Nous avons montré qu'une privation de sommeil augmente significativement l'expression de *Tet3* dans le cortex cérébral des souris (données non publiées). Nos observations dans l'article 1 suggèrent qu'une privation de sommeil augmente le nombre de site génomique hydroxyméthylé, notamment au niveau de gènes associés à la plasticité synaptique. Nous pouvons imaginer que dans un contexte de privation de sommeil, l'5hmC qui peut déméthyliser l'ADN, est augmentée et pourrait permettre ainsi l'expression de gènes qui étaient précédemment méthylés et dont la transcription était réprimée, permettant au système d'ajuster sa réponse transcriptionnelle à la privation de sommeil.

En conclusion, nos résultats montrent que la privation de sommeil induit des modifications épigénétiques au niveau de la 5mC et de l'5hmC qui va aboutir à une régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans la plasticité synaptique, suggérant ainsi un rôle de la 5mC et de l'5hmC dans la régulation du sommeil. Il serait intéressant d'explorer l'effet de ces modifications épigénétiques (en inhibant la méthylation de l'ADN par exemple) sur la réponse électrophysiologique mesurée par EEG.

4.5. Rôle du récepteur EphA4 dans la plasticité synaptique lors du sommeil

4.5.1. Effet de l'absence d'EphA4 dans la régulation du sommeil

Nos observations montrent que l'absence du récepteur EphA4 modifie l'architecture du sommeil notamment par une diminution de la durée de SP ainsi que par une consolidation des

états de vigilance plus forte. Cependant, l'analyse de l'activité spectrale n'a pas révélé de changements dans l'activité delta qui est le marqueur EEG principal du processus homéostatique (Achermann et al., 1993; Beersma, 1998; Borbely and Achermann, 1999). Même après une privation de sommeil qui sert à augmenter la pression homéostatique, nous n'avons pas vu de différence dans l'activité delta pendant le SOL entre les génotypes. De manière intéressante, nous avons observé que la dynamique de l'activité sigma au courant de la journée était atténuée pendant le SOL chez les souris n'exprimant pas *EphA4*. Notre hypothèse de départ était que l'absence d'*EphA4* allait modifier le processus homéostatique de la régulation du sommeil, or il s'avère que notre hypothèse était fautive et que le récepteur EphA4 semble contribuer de manière plus notable au processus circadien de la régulation du sommeil. En effet, le phénotype du sommeil des souris *EphA4*^{-/-} semble montrer une régulation homéostatique préservée alors que plusieurs paramètres dépendants du processus circadien de la régulation du sommeil sont affectés chez les souris *EphA4*^{-/-} tels que la durée en SP qui est conservée après privation de sommeil, ce qui illustre un phénotype robuste, ainsi que l'activité sigma (Dijk and Czeisler, 1995; Dijk et al., 1997; Yasenkov and Deboer, 2011).

La diminution de la durée du SP peut s'expliquer par des défauts dans l'activité de neurones cholinergiques du noyau tegmantal pédonculopontin (PPT). Le PPT semble avoir un rôle important dans la régulation du SP (Datta and Siwek, 1997; Lu et al., 2006). En effet, des études ont montré que des lésions unilatérales et bilatérales des neurones cholinergiques du PPT diminuent le SP (Webster and Jones, 1988; Datta and Hobson, 1995) alors que des injections de glutamate à faible et moyenne concentration dans le PPT augmente la quantité de SP (Datta and Siwek, 1997). Étant donné le rôle du récepteur EphA4 dans la plasticité synaptique et l'effet de son absence sur la plasticité fonctionnelle qui induit une diminution de la LTP dans l'hippocampe (Grunwald et al., 2004; Filosa et al., 2009), l'absence d'EphA4 pourrait affecter l'activité des neurones cholinergiques dans le PPT ce qui aboutirait à une diminution de la durée du SP que nous observons chez les souris n'exprimant pas EphA4.

L'activité sigma pendant le SOL a été associée aux processus impliqués dans la mémoire. Fogel et collaborateurs ont montré en 2007 que la puissance de l'activité sigma était augmentée après l'apprentissage d'une tâche procédurale qui implique un apprentissage moteur (Fogel et al., 2007). Une autre étude chez l'humain a montré qu'après avoir effectué une tâche de mémoire déclarative, qui est une mémoire connue pour être dépendante de l'activité de l'hippocampe (Buzsaki, 1998), les sujets montrent une augmentation de la densité des fuseaux pendant le SOL (Gais et al., 2002). Chez le rat, les performances dans une tâche de reconnaissance d'objet sont corrélées positivement avec la quantité de fuseaux pendant le SOL (Oyanedel et al., 2014). Ainsi, l'activité sigma et la fréquence des fuseaux sont fortement associées à l'activité de l'hippocampe. Le récepteur EphA4 est exprimé dans l'hippocampe et y exerce un rôle important dans la plasticité structurale et fonctionnelle comme nous l'avons décrit dans la **section 1.2.2.4**. (Murai et al., 2003; Grunwald et al., 2004; Filosa et al., 2009). Chez les souris EphA4^{-/-}, nous avons observé que l'activité sigma pendant le SOL était atténuée. Cette observation peut s'expliquer par l'absence de l'expression d'*EphA4* dans l'hippocampe chez ces souris qui affecterait la plasticité fonctionnelle et structurale de l'hippocampe, et donc la dynamique de l'activité sigma pendant le SOL.

Malgré qu'aucune différence dans les marqueurs EEG de l'homéostasie du sommeil n'a été identifiée, la pression pour le sommeil induit par la privation de sommeil augmente l'expression d'*EphA4* dans la région thalamique/hypothalamique chez les souris C57BL/6J. De plus, nous avons pu voir que l'expression de certains partenaires d'*EphA4* changeait en fonction du temps du jour dans différentes régions cérébrales associés à la régulation du sommeil. Un autre résultat supportant l'implication du récepteur EphA4 dans la régulation circadienne est le contrôle de l'expression d'*EphA4* et de certains partenaires d'interaction par les gènes de l'horloge. En effet, nous avons pu voir que l'expression d'*EphA4* était significativement diminuée dans le cerveau de souris mutante pour *Clock*. Nous n'avons pas été en mesure d'évaluer l'expression d'*EphA4* et de certains de ces partenaires au niveau de régions plus précises telles que le cortex, l'hippocampe ou encore les SCN de souris mutantes pour *Clock*, mais il serait important de regarder si cette diminution de l'expression d'*EphA4* a lieu de manière globale ou

au contraire au niveau de régions précises. De plus, nous avons identifié plusieurs éléments permettant la fixation des gènes de l'horloge, les « E-Boxes », dans la région promotrice d'*EphA4* et d'un de ces principaux partenaires d'interaction éphrine-B3. Ceci suggère fortement que l'expression d'*EphA4* et d'*EfnB3* soit régulée par la machinerie moléculaire de l'horloge biologique. Ainsi, *EphA4* pourrait être une sortie de l'horloge modulant la plasticité synaptique à des moments précis du temps du jour. L'expression rythmique d'*EfnB3* qui augmente significativement à la fin de la période de repos (ZT12) dans le cortex et la région thalamique/hypothalamique suggère que les mécanismes de la plasticité induits par ce ligand et son interaction avec *EphA4* (Zhuang et al., 2010) changent en fonction du temps du jour. L'expression d'*EfnA3* dans l'hippocampe diminue significativement à la fin de la période de repos et il a été montré que l'interaction entre éphrine-A3 et *EphA4* dans l'hippocampe conduisait à une maturation des épines dendritiques (Murai et al., 2003). Ainsi des changements dans l'interaction entre ces deux protéines permettraient au cerveau de stabiliser certaines synapses et ce processus serait dépendant du temps du jour.

4.5.2. Implication d'une voie de signalisation d'*EphA4*

Comme mentionné dans l'introduction, l'activation du récepteur *EphA4* recrute généralement la famille des GTPases telles que Rho, Rac et Cdc42 (pour revue Kullander and Klein, 2002). Les Rho GTPases sont d'importants éléments dans le développement neuronal. En effet, Rac1 et Cdc42 vont promouvoir l'élongation axonale (Gonzalez-Billault et al., 2012) alors que RhoA (appelé Rho1 chez la drosophile) favorise la rétraction axonale (Hall, 2012). Une étude récente a montré que l'activité GTPasique de Rho1 présentait un rythme circadien (Petsakou et al., 2015). Cette activité rythmique de Rho1 a été étudiée dans des neurones dont le rôle a déjà été identifié dans le comportement circadien, les petits neurones latéro-ventraux (s-LNV) chez la drosophile (Renn et al., 1999; Stoleru et al., 2004). Petsakou et collaborateurs ont découvert que l'activité endogène de Rho1 présentait une activité circadienne permettant une contraction de l'actine aboutissant ainsi à la rétraction des axones des neurones latéro-ventraux (Petsakou et al., 2015). Chez les mammifères, les neurones du SCN possèdent également un rythme au

niveau de la structure synaptique et des connections entre les neurones et les astrocytes (Becquet et al., 2008; Girardet et al., 2010). Ces mouvements structuraux au sein du SCN pourraient être contrôlés par l'activité d'EphA4 qui modulerait l'activité des Rho GTPases responsable de la contraction de l'actine. Ainsi, ce contrôle au niveau de la plasticité structurale des SCN pourrait influencer la régulation circadienne du sommeil. Cependant, bien que nous ayons observé que le récepteur EphA4 était exprimé dans les SCN, plusieurs expériences devront être effectuées afin de comprendre son rôle dans les SCN. Il serait intéressant de faire des expériences de co-localisation pour identifier dans quel type cellulaire s'exprime le récepteur EphA4 par exemple en effectuant un double marquage immunohistochimique avec la GFAP (« Glial Fibrillary Acidic Protein »), marqueur des astrocytes, et le récepteur EphA4, ce qui pourrait informer sur un rôle d'EphA4 dans le SCN médié via les astrocytes.

4.5.3. Implication du récepteur EphA4 dans les processus mnésiques

En condition normale, les souris *EphA4*^{-/-} ont des épisodes individuels d'éveil et de SOL plus longs et donc une consolidation de l'éveil et du SOL plus importante au détriment de la durée de SP qui est diminuée. Les études sur la fragmentation du sommeil et la mémoire ont montré que la mémoire était altérée lorsque le sommeil est fragmenté (Wallace et al., 2015). Mais, chez les souris EphA4 mutantes étudiées dans notre article 2, cette augmentation de la consolidation des états de vigilances n'est pas associée à des performances mnésiques plus importantes. En effet, il a été montré que les souris *EphA4*^{-/-} possèdent des déficits cognitifs en particulier dans la mémoire de la reconnaissance spatiale (Willi et al., 2012) et dans la mémoire de peur conditionnée (Dines et al., 2015). Les problèmes de mémoire pourraient être liés à la durée de SP qui est diminuée ainsi qu'à la dynamique de l'activité sigma qui est altérée au cours de la journée chez les souris *EphA4*^{-/-}, car ces deux variables de sommeil ont été associées à des processus mnésiques dépendants ou non de l'hippocampe (Diekelmann and Born, 2010). Des études complémentaires devront être menées afin de mieux comprendre la contribution des perturbations de l'architecture du sommeil sur les capacités mnésiques des souris *EphA4*^{-/-}.

De manière intéressante, une implication du récepteur EphA4 a été révélée dans des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Tout d'abord, une élévation du niveau d'ARNm d'*EphA4* a été retrouvée chez des patients atteints par la maladie d'Alzheimer. En effet, au niveau synaptoneurosomal du cortex préfrontal, l'expression d'*EphA4* est doublée chez ces patients (Williams et al., 2009). D'autre part, des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ont révélé que la signalisation d'EphA4 était amplifiée dans l'hippocampe de souris transgéniques servant de modèle pour la maladie d'Alzheimer (Fu et al., 2014) et que la signalisation intracellulaire d'EphA4 pouvait médier les effets délétères sur la plasticité induite par le dépôt d'oligomère A β (Vargas et al., 2014). Une délétion d'*EphA4* dans l'hippocampe de souris transgéniques permet de rétablir la LTP ce qui suggère que les effets délétères sur la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe sont médiés par le récepteur EphA4 (Fu et al., 2014). Enfin, dans cette même étude, la réduction de l'activité du récepteur EphA4 restaure les déficits observés au niveau de la LTP (Fu et al., 2014). Ces observations montrent que le récepteur EphA4 joue un rôle déterminant dans les changements de plasticité synaptique observés dans cette pathologie et pourrait être une cible thérapeutique. Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez l'humain et chez les rongeurs la maladie d'Alzheimer provoque une altération des rythmes circadiens (Musiek et al., 2015). Dans la maladie d'Alzheimer, le récepteur EphA4 pourrait avoir une activité altérée par les oligomères A β et ceci altérerait ses fonctions au niveau des processus cognitifs et circadiens. En combinaison avec ces observations, nos résultats suggèrent donc que des modifications de l'expression d'*EphA4* pourraient contribuer autant aux changements cognitifs et circadiens observés dans certaines maladies neurodégénératives.

4.5.4. Contrôle de la transcription par le récepteur EphA4

L'activation du récepteur EphA4 peut agir également sur les processus de transcription de gènes pouvant être impliqués dans la plasticité synaptique. En effet, la stimulation de la phosphorylation d'EphA4 par sa liaison avec le ligand éphrine-A5 active la voie des MAP kinases (« Mitogen-Activated Protein Kinase », MAPK Shin et al., 2008). Une autre étude a montré que l'interaction entre les deux domaines intracellulaires du récepteur EphA4 et d'une autre famille

de récepteur à tyrosine kinase, les FGFs, conduit à l'activation des MAPK (Yokote et al., 2005). La voie de signalisation des MAPK est connue pour réguler l'expression de 200 à 500 gènes dépendamment du type cellulaire et du type de stimulus d'activation de la voie des MAPK (pour revue Roberts et al., 2000; Bennett et al., 2013; Goldsmith and Bell-Pedersen, 2013). De plus, la signalisation des MAPK possède différents rôles dans les rythmes circadiens. Cette signalisation a un rôle dans l'intégration de la stimulation photique dans les SCN. En effet, la lumière active la voie des MAPK, ce qui va organiser l'activation transcriptionnelle requise pour l'expression des gènes de l'horloge (pour revue Goldsmith and Bell-Pedersen, 2013). D'autre part, la voie de signalisation des MAPK peut agir comme une sortie de l'horloge au niveau d'autres régions que le SCN comme l'hippocampe. Dans l'hippocampe, les cycles de phosphorylation des MAPK possèdent un rythme endogène qui augmente lors de la période de repos des souris (Eckel-Mahan et al., 2008). Et cette rythmicité endogène requière des SCN intacts (Phan et al., 2011). De plus, l'activité de la signalisation des MAPK est plus importante pendant le SP (Luo et al., 2013) et chez le rat une injection en intracérébroventriculaire (ICV) d'un inhibiteur de la voie des MAPK diminue la quantité de SP, ce qui suggère que la signalisation des MAPK favorise la quantité de SP (Diaz-Ruiz et al., 2001). Ainsi, la voie de signalisation des MAPK a été associée aux aspects circadiens (Eckel-Mahan et al., 2008) mais contribue également à la durée du SP. Toutefois, les mécanismes en aval n'ont pas encore été identifiés. Les modifications observées dans le processus circadien de la régulation du sommeil et la diminution de SP observée chez les souris *EphA4*^{-/-} pourrait être expliquées par le rôle du récepteur EphA4 dans l'activation de la voie des MAPK. Ainsi, le récepteur EphA4 pourrait être un médiateur de cette voie, qui par son activation entraînerait la signalisation des MAPK pendant le SP et participerait ainsi aux processus de mémorisation ayant lieu dans l'hippocampe lors du SP (Ishikawa et al., 2006; Ravassard et al., 2015). Toutefois, notre étude par microarray dans le deuxième article ne montre pas de différence dans l'expression des gènes chez les souris *EphA4*^{-/-} en comparaison avec les souris sauvages.

4.6. Implication des neurones à VIP dans le rôle du récepteur EphA4 sur le processus circadien

Une analogie a été observée entre l'effet de l'absence d'EphA4 et l'effet de l'absence de VIP sur l'architecture du sommeil des souris, et plus précisément sur la durée du SP et la consolidation des états de vigilance. Le noyau suprachiasmatique est constitué d'une paire de noyau situé de part et d'autre du troisième ventricule juste au dessus du chiasma optique (Van den Pol, 1980). D'un point de vue anatomique, le noyau suprachiasmatique est divisé en deux parties ; une partie ventrolatérale ou encore appelé le « core » et une partie dorsomédiale, le « shell » (Morin et al., 2006). Les stimuli externes tels que la lumière sont intégrés par les neurones ventrolatéraux du SCN qui sont considérés comme les intégrateurs des informations externes et transmettent l'information aux autres neurones du SCN (pour revue Morin and Allen, 2006; Vosko et al., 2007). Des études chez le rat, ont montré que les SCN contenaient beaucoup de neurones à VIP (Roberts et al., 1980; Besson et al., 1986) et plus particulièrement au niveau de la partie ventrolatérale du SCN (Ibata et al., 1989; Abrahamson and Moore, 2001). Les neurones à VIP possèdent un rôle crucial dans la génération des rythmes circadiens ainsi que dans leur régulation par la lumière (Welsh et al., 1995; pour revue Vosko et al., 2007). Des souris mutantes pour le VIP ou pour le récepteur au VIP, le VPAC2 (*Vipr2*), présentent une altération de l'activité rythmique (Harmar et al., 2002; Colwell et al., 2003). Aton et collaborateurs ont montré que des souris n'exprimant pas le *Vip* ou le *Vipr2* présentent une perturbation de l'entraînement des comportements circadiens en condition 12h de lumière et 12h d'obscurité (Aton et al., 2005). Lorsqu'on place ces souris en obscurité constante, la génération d'un rythme circadien semble persister mais la synchronisation est affectée (Aton et al., 2005). De plus, ces auteurs ont montré que l'absence du VIP et de son récepteur induisait une perte de la synchronie neuronale au sein des SCN (Aton et al., 2005). Ainsi, le VIP et son récepteur VPAC2 ont un rôle important dans le maintien des fonctions du SCN (Harmar et al., 2002). Le VIP est donc nécessaire à la synchronie de l'activité neuronale entre les neurones dans le SCN. Mais les mécanismes par lesquels les neurones à VIP synchronisent les autres cellules du SCN ne sont pas encore bien compris.

Nous avons observé dans notre article accepté par le journal « Sleep » que le récepteur EphA4 était exprimé dans le SCN mais que son absence n'affectait pas l'expression des principaux neuropeptides du SCN tels que *Grp* (« Gastrin-Releasing peptide), *Avp* (« Arginine Vasopressin ») ou encore *Vip*, ni le nombre de cellule exprimant ces peptides dans le SCN. Nous pouvons cependant supposer que le récepteur EphA4 a un effet modulateur sur le processus circadien de la régulation du sommeil émanant des SCN, et en particulier au niveau de la transmission du VIP. En effet, les souris *Vip*^{-/-} présentent une architecture du sommeil perturbée similaire à celle des souris *EphA4*^{-/-}. Les souris *Vip*^{-/-} ont une réduction de la durée du SP ainsi qu'une augmentation de la consolidation des états de vigilance (Hu et al., 2011). De plus, l'injection en ICV de VIP chez le rat, le lapin ou le chat induit une augmentation significative de la quantité de SP (Kruisbrink et al., 1987; Obal et al., 1989; Jimenez-Anguiano et al., 1993) alors que l'injection d'un antagoniste du VIP chez des rats provoque une diminution de la quantité de SP (Mirmiran et al., 1988). L'absence du récepteur EphA4 n'affecte pas l'expression du *Vip* mais pourrait modifier son expression protéique ou encore sa transmission. En effet, le récepteur EphA4 pourrait jouer un rôle dans la sécrétion de VIP notamment par son interaction avec le ligand éphrine-B3 qui augmente la libération de D-Sérine par les astrocytes et qui pourrait ainsi augmenter l'excitabilité des neurones à VIP. Ainsi, la diminution du SP chez les souris *EphA4*^{-/-} pourrait être expliquée par des perturbations de la sécrétion de VIP, ce qui altérerait la synchronie des neurones du SCN et induirait un déficit dans le processus circadien contrôlant le sommeil.

4.7. La rétraction astrocytaire

Le rôle du récepteur EphA4 dans la plasticité synaptique ne se limite pas à la plasticité neuronale. De par son rôle dans la communication neurone-glie, le récepteur EphA4 pourrait être impliqué dans la plasticité structurale des SCN. En effet, la couverture astrocytaire au niveau des dendrites des neurones à VIP change en fonction du temps du jour (Girardet et al., 2010). Nos observations montrent que l'absence du récepteur EphA4 induit une diminution de la quantité de SP et semble altérer le processus circadien de la régulation du sommeil. De plus, nous avons vu que le récepteur EphA4 est exprimé dans les SCN. Dans la section précédente,

nous avons vu que le VIP augmentait la quantité de SP (Kruisbrink et al., 1987; Obal et al., 1989; Jimenez-Anguiano et al., 1993). Il est possible que le récepteur EphA4 soit un élément important dans ces mouvements astrocytaires dans le but de contrôler la libération du VIP ou l'excitabilité des neurones à VIP. En effet, il a été montré que l'interaction d'EphA4 et de son ligand éphrine-B3 situé au niveau des astrocytes modifie la potentialisation synaptique en contrôlant la libération de D-sérine par les astrocytes (Zhuang et al., 2010). De plus, Murai et collaborateurs ont montré qu'une interaction entre EphA4, situé au niveau du neurone post-synaptique et d'éphrine-A3 sur les astrocytes régulaient la structure de la synapse en stabilisant la morphologie post-synaptique (Murai et al., 2003). L'expression et la localisation post-synaptique d'EphA4 et astrocytaire de l'éphrine-A3 ont été bien documentées (Murai et al., 2003; Tremblay et al., 2007; Carmona et al., 2009; Filosa et al., 2009; Tremblay et al., 2009). L'absence d'EphA4 favorise le développement d'épines dendritiques non matures (Murai et al., 2003), ainsi l'activation du récepteur EphA4 induirait un signal répulsif ce qui favoriserait la rétraction des épines dendritiques (Murai et al., 2003). L'interaction entre EphA4 et éphrine-A3 pourrait permettre de réduire le nombre de synapses non matures et contrôlerait l'infiltration de feuillet astrocytaires au niveau de la fente synaptique. Ainsi, ces observations suggèrent fortement que le récepteur EphA4 est un élément important dans la régulation de la communication neurone-astrocyte, à la fois associé à la libération de D-sérine ainsi qu'à des modifications structurales de la synapse faisant intervenir les astrocytes (Murai and Pasquale, 2002). Donc, le récepteur EphA4 pourrait contrôler le processus circadien de la régulation du sommeil dans le SCN via une action sur les astrocytes, qui régulerait l'excitabilité et la libération de VIP et contrôlerait le SP.

Une étude récente a montré que le récepteur EphA4 était impliqué dans la rétraction astrocytaire au niveau du noyau supraoptique (NSO) de l'hypothalamus. En effet, Daniella Isacu a présenté en mai 2012 une étude sur le rôle du récepteur EphA4 dans la rétraction astrocytaire au niveau des neurones à ocytocine dans le NSO à la suite d'un traitement à l'eau salée (Isacu, 2012). Ses résultats suggèrent que les changements structuraux neurono-gliaux sont spécifiques aux neurones à ocytocine et dépendants du récepteur EphA4. En effet, la consommation d'eau salée (2% NaCl) chez la souris augmente l'expression de l'ARNm d'*EphA4* et particulièrement au

niveau de la membrane post-synaptique des dendrites (Isacu, 2012). Cette augmentation de l'expression d'*EphA4* est accompagnée par un recouvrement astrocytaire des neurones à ocytocine diminué de près de la moitié en comparaison à des souris non traitées au sel. Par contre, cette rétraction astrocytaire n'a pas été observée chez les souris *EphA4*^{-/-} (Isacu, 2012). L'ensemble de ces observations suggère que le récepteur EphA4 soit un élément clé dans les mécanismes à la base des changements structuraux neurono-gliaux du NSO. Toutefois, dans cette étude, aucune mesure n'a été faite sur la quantité d'ocytocine libérée après la consommation d'eau salée, mais il a été démontré chez le rat qu'une consommation d'eau salée (2% NaCl) pendant 7 jours augmentait significativement la concentration plasmatique d'ocytocine en comparaison à des rats témoins (Greenwood et al., 2015). Nous pouvons spéculer que dans un tel contexte, la rétraction astrocytaire induite par le récepteur EphA4 favoriserait la libération de l'ocytocine dans le système. Ainsi, nous pouvons imaginer un mécanisme de régulation des changements structuraux neurono-gliaux similaires à ceux observés dans les NSO au niveau des SCN.

4.8. Limites de nos études

4.8.1. Utilisation de souris KO

L'utilisation des souris KO est une technique permettant d'invalider un gène afin d'observer les conséquences physiologiques de l'absence de ce gène. Dans nos études, nous avons eu la chance de pouvoir étudier le sommeil dans un tel modèle, or ce modèle présente certaines limites. En effet, un animal qui naît en l'absence d'une protéine peut développer des compensations développementales. Afin de palier à l'absence d'une protéine, l'organisme peut surexprimer une autre protéine de la même famille par exemple. Une alternative aux souris KO serait l'utilisation de la technique de recombinaison par le système Cre-Lox. Ce système utilise une enzyme, la Cre recombinase, qui reconnaît deux sites LoxP et recombine les deux sites entre eux (pour revue Nagy, 2000). Si les deux sites LoxP sont orientés dans la même direction sur le même chromosome, l'action de la Cre recombinase induit la délétion de la séquence d'ADN comprise entre les deux sites LoxP (pour revue Nagy, 2000). Pour utiliser cette technique,

il faut croiser deux lignées de souris, une lignée exprimant la Cre recombinase de manière générale ou dans une population de neurone particulière et une lignée de souris dite « floxée » qui possèdent les deux sites LoxP entourant la partie du gène à déléter. Ce système permet une régulation spatiale de la délétion d'un gène en soumettant l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Il est également possible d'avoir un contrôle temporel grâce aux systèmes inductibles de la Cre-recombinase. Il existe deux modèles de systèmes inductibles, le premier est le modèle de tétracycline/doxycycline et le deuxième modèle est celui du tamoxifène (Denton et al., 2009 ; pour revue Gunschmann et al., 2014). L'induction de l'expression de la Cre-recombinase est sous le contrôle d'agents tels que la tétracycline, la doxycycline ou encore le tamoxifène qui, quand ils sont administrés au moment voulu, dans la nourriture ou l'eau de boisson, activent la transcription de la Cre-recombinase et donc induire la délétion du gène désiré (pour revue Gunschmann et al., 2014).

Afin de compléter et de confirmer nos observations faites sur les souris *Nlgn1*^{-/-} et *EphA4*^{-/-}, il serait intéressant de mener une étude chez des souris adultes auxquelles nous procéderions à une injection par minipompe d'ARN interférent *Nlgn1* d'une part ou d'*EphA4* d'autre part dans le 3^{ème} ventricule contre. Une approche par infection virale avec des adénovirus contenant les ARN interférents serait également envisageable.

4.8.2. Résolution spatiale et cellulaire de l'analyse par microarray

Les microarrays constituent un outil technologique qui apporte des informations d'une grande richesse. Afin de mener à bien nos expériences, nous avons pris la totalité du prosencéphale pour l'extraction de l'ARNm des animaux mutants. Ce choix diminue notre résolution spatiale dans nos études et peut masquer certains effets. Les différentes régions cérébrales ne répondent pas de la même manière à la privation de sommeil et la fonction des différentes régions cérébrales peut être différente en fonction de l'état de vigilance dans lequel nous nous trouvons. Ainsi, pour *Nlgn1*, il aurait été intéressant de regarder les changements d'expression de gènes spécifiquement dans le cortex cérébral puisque nos résultats indiquent que son absence altère la dynamique des ondes lentes. Pour le récepteur *EphA4*, considérant son rôle dans le processus circadien de la régulation du sommeil, il serait pertinent de regarder

les changements dans le SCN ou encore dans l'hippocampe étant donné sa forte expression dans cette structure.

En plus de la résolution spatiale, la technique utilisée ne nous permet pas d'avoir une résolution cellulaire. Nous ne pouvons pas déterminer comment les neurones, la microglie ou encore les astrocytes réagissent à la privation de sommeil et modifient leur expression génique. Par exemple, dans notre premier article, nous avons trouvé que le seul gène différentiellement exprimé chez les souris *Nlgn1*^{-/-} après privation de sommeil était *Fgf1*, qui augmente son expression après privation de sommeil. Des observations récentes ont montré que ce gène était spécifiquement augmenté après privation de sommeil dans les oligodendrocytes (Bellesi et al., 2013). Cette étude a aussi montré que l'effet de la privation de sommeil peut être différent suivant le type cellulaire. Toutefois, nos résultats nous apportent une vision globale de l'effet de la privation sur le transcriptome dans toutes les cellules.

4.8.3. Étude de la méthylation au niveau du promoteur

Une autre limite concerne notre étude sur les modifications épigénétiques induites par le manque de sommeil. En effet, cette étude, qui visait à comprendre l'effet de la privation de sommeil sur les modifications de la méthylation de l'ADN, n'a pas été menée sur l'ensemble du génome. Nous avons sélectionné une région précise de -1200 paires de base (pb) à 2400 pb après le site du début de la transcription. Toutefois, de plus en plus de données indiquent que la méthylation au niveau du corps du gène, des régions intergéniques ainsi que des régions 3'UTR est associée avec une régulation différente du gène (Maunakea et al., 2010; Kulis et al., 2013; Maussion et al., 2014). Ainsi, il est possible que nous ayons manqué des sites au niveau des gènes qui étaient différentiellement méthylés après une privation de sommeil et cela pourrait expliquer pourquoi nous avons peu de gènes différentiellement méthylés après privation de sommeil en comparaison aux différences observées dans l'hydroxyméthylation.

4.9. Conclusions et perspectives

Je considère que mon projet de thèse se démarque par son originalité d'avoir étudié l'implication de nouvelles molécules dans la régulation du sommeil. Ce travail a permis de mettre en lumière pour la première fois le rôle de nouveaux éléments dans les processus régulateurs du sommeil. En effet, nos résultats montrent que deux familles de molécules d'adhésion cellulaire, les NLGNs et les récepteurs Eph ainsi que leurs ligands, les éphrines, contribuent de manières différentes aux processus régulateurs du sommeil.

Tout d'abord, *Nlgn1* a été identifié comme étant une molécule impliquée dans le processus homéostatique de régulation du sommeil et contribuant au maintien de l'éveil. Son absence altère la synchronie corticale illustrée par une pente des ondes lentes plus élevée. De plus, l'expression de variants spécifiques de *Nlgn1* montre une sensibilité à la pression du sommeil. En résumé, nous proposons que l'éveil prolongé régule négativement *Nlgn1* contenant l'insert A et B, ce qui perturbe le fonctionnement normal de la synapse et en conséquence la synchronie corticale, qui est augmentée en l'absence de *Nlgn1*. Le récepteur EphA4, quant à lui, serait plus enclin à réguler le processus circadien de la régulation de sommeil. En effet, nous avons pu montrer que son absence affecte des variables du sommeil dépendantes du processus circadien, mais n'altère pas la dynamique de l'activité delta après une privation de sommeil. De plus, l'expression de certains de ses partenaires est modifiée en fonction du temps du jour. Enfin, le récepteur EphA4 est exprimé au niveau des SCN, l'horloge principale de l'organisme. Pour conclure, nous suggérons que le récepteur EphA4 participe à la régulation circadienne du sommeil et agirait comme une sortie de l'horloge pouvant modifier la plasticité synaptique. En plus de l'identification de ces deux molécules d'adhésion cellulaire, nous avons été les premiers à démontrer qu'une privation de sommeil de 6h affectait la distribution des marques épigénétiques sur le génome. Nos résultats suggèrent fortement que les modifications épigénétiques telles que la méthylation et l'hydroxyméthylation, après une privation aigue de sommeil, permettent d'ajuster le transcriptome de l'organisme afin de générer une réponse adaptée à l'éveil prolongé.

Des expériences supplémentaires devront être menées afin d'apporter une meilleure compréhension des cascades cellulaires impliquées dans la régulation du sommeil par Nlgn1, notamment en étudiant les partenaires d'interaction de NLGN1. De la même manière, nous n'avons pas exploré les voies de signalisation intracellulaire du récepteur EphA4 qui seraient affectées par la privation de sommeil ou en fonction du temps du jour. Il serait donc intéressant de comprendre plus précisément l'effet de la privation de sommeil sur les mécanismes intracellulaires. Des expériences de colocalisation permettraient de comprendre le rôle d'EphA4 au niveau des SCN. De plus, comme nous proposons un rôle du récepteur EphA4 dans la régulation circadienne du sommeil, une prochaine étape serait d'étudier les comportements circadiens des souris *EphA4*^{-/-} dans le but d'élucider son rôle dans les rythmes circadiens au delà de celui dans la régulation circadienne du sommeil. Cela pourrait s'effectuer en procédant à des expériences de mesure de l'activité circadienne des souris *EphA4*^{-/-} en condition d'obscurité constante. Enfin, comme prolongement de l'étude des effets de la privation de sommeil sur les modifications épigénétiques, nous menons actuellement une étude explorant l'effet de l'inhibition de la méthylation de l'ADN sur l'activité EEG pour comprendre l'effet de la méthylation de l'ADN sur l'activité EEG en condition normale ou après privation de sommeil.

Finalement, nos études permettent de mieux comprendre les mécanismes des processus régulateurs du sommeil et de clarifier le rôle des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans la plasticité Hebbienne et non-Hebbienne qui ont lieu durant la régulation du sommeil et inversement, d'identifier l'effet des processus régulateurs du sommeil sur ces deux types de molécules d'adhésion cellulaire. Ainsi une meilleure compréhension des processus régulateurs du sommeil permettent d'apporter de nouvelles pistes thérapeutiques à explorer afin d'améliorer la qualité du sommeil.

Bibliographie

(1997). "Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee." Cell **90**(3): 403-404.

Abe, H., Honma, S., Namihira, M., Tanahashi, Y., Ikeda, M. and Honma, K. (1998). "Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats." Neurosci Lett **258**(2): 93-96.

Abrahamson, E. E. and Moore, R. Y. (2001). "Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections." Brain Res **916**(1-2): 172-191.

Achermann, P., Dijk, D. J., Brunner, D. P. and Borbely, A. A. (1993). "A model of human sleep homeostasis based on EEG slow-wave activity: quantitative comparison of data and simulations." Brain Res Bull **31**(1-2): 97-113.

Aeschbach, D. and Borbely, A. A. (1993). "All-night dynamics of the human sleep EEG." J Sleep Res **2**(2): 70-81.

Aeschbach, D., Dijk, D. J. and Borbely, A. A. (1997). "Dynamics of EEG spindle frequency activity during extended sleep in humans: relationship to slow-wave activity and time of day." Brain Res **748**(1-2): 131-136.

Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G. and Lee, C. C. (1997). "A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light." Cell **91**(7): 1055-1064.

Andretic, R., Franken, P. and Tafti, M. (2008). "Genetics of sleep." Annu Rev Genet **42**: 361-388.

Aoto, J. and Chen, L. (2007). "Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions." Brain Res **1184**: 72-80.

Arrigoni, E., Chamberlin, N. L., Saper, C. B. and McCarley, R. W. (2006). "Adenosine inhibits basal forebrain cholinergic and noncholinergic neurons in vitro." Neuroscience **140**(2): 403-413.

Aserinsky, E. and Kleitman, N. (1953). "Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep." Science **118**(3062): 273-274.

Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J. and Herzog, E. D. (2005). "Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons." Nat Neurosci **8**(4): 476-483.

Aton, S. J., Seibt, J., Dumoulin, M., Jha, S. K., Steinmetz, N., Coleman, T., Naidoo, N. and Frank, M. G. (2009). "Mechanisms of sleep-dependent consolidation of cortical plasticity." Neuron **61**(3): 454-466.

Aton, S. J., Suresh, A., Broussard, C. and Frank, M. G. (2014). "Sleep promotes cortical response potentiation following visual experience." Sleep **37**(7): 1163-1170.

Ayas, N. T., White, D. P., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Speizer, F. E., Malhotra, A. and Hu, F. B. (2003). "A prospective study of sleep duration and coronary heart disease in women." Arch Intern Med **163**(2): 205-209.

Baracchi, F. and Opp, M. R. (2008). "Sleep-wake behavior and responses to sleep deprivation of mice lacking both interleukin-1 beta receptor 1 and tumor necrosis factor-alpha receptor 1." Brain Behav Immun **22**(6): 982-993.

Barrow, S. L., Constable, J. R., Clark, E., El-Sabeawy, F., McAllister, A. K. and Washbourne, P. (2009). "Neurologin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis." Neural Dev **4**: 17.

Basheer, R., Brown, R., Ramesh, V., Begum, S. and McCarley, R. W. (2005). "Sleep deprivation-induced protein changes in basal forebrain: implications for synaptic plasticity." J Neurosci Res **82**(5): 650-658.

Baudouin, S. and Scheiffele, P. (2010). "SnapShot: Neurologin-neurexin complexes." Cell **141**(5): 908, 908 e901.

Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S. and Malenka, R. C. (2002). "Control of synaptic strength by glial TNFalpha." Science **295**(5563): 2282-2285.

Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., Francois-Bellan, A. M. and Bosler, O. (2008). "Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment." Glia **56**(3): 294-305.

Beersma, D. G. (1998). "Models of human sleep regulation." Sleep Med Rev **2**(1): 31-43.

Bellesi, M., Pfister-Genskow, M., Maret, S., Keles, S., Tononi, G. and Cirelli, C. (2013). "Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors." J Neurosci **33**(36): 14288-14300.

Bennett, L. D., Beremand, P., Thomas, T. L. and Bell-Pedersen, D. (2013). "Circadian activation of the mitogen-activated protein kinase MAK-1 facilitates rhythms in clock-controlled genes in *Neurospora crassa*." Eukaryot Cell **12**(1): 59-69.

Benson, M. D., Romero, M. I., Lush, M. E., Lu, Q. R., Henkemeyer, M. and Parada, L. F. (2005). "Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10694-10699.

Bergemann, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R. and Flanagan, J. G. (1995). "ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites." Mol Cell Biol **15**(9): 4921-4929.

Besson, J., Sarrieau, A., Vial, M., Marie, J. C., Rosselin, G. and Rostene, W. (1986). "Characterization and autoradiographic distribution of vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat central nervous system." Brain Res **398**(2): 329-336.

Bettis, R., Iacuzio, D., Jung, T., Fuchs, R., Aultman, R. and Gyldmark, M. (2006). "Impact of influenza treatment with oseltamivir on health, sleep and daily activities of otherwise healthy adults and adolescents." Clin Drug Investig **26**(6): 329-340.

Bird, A. (2007). "Perceptions of epigenetics." Nature **447**(7143): 396-398.

Bjorkum, A. A., Bjorvatn, B., Neckelmann, D. and Ursin, R. (1995). "Sleep effects following intrathecal administration of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT and the NMDA antagonist AP-5 in rats." Brain Res **692**(1-2): 251-258.

Blundell, J., Blaiss, C. A., Etherton, M. R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., Bolliger, M. F., Sudhof, T. C. and Powell, C. M. (2010). "Neurologin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior." J Neurosci **30**(6): 2115-2129.

Bolliger, M. F., Frei, K., Winterhalter, K. H. and Gloor, S. M. (2001). "Identification of a novel neurologin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression." Biochem J **356**(Pt 2): 581-588.

Bolliger, M. F., Pei, J., Maxeiner, S., Boucard, A. A., Grishin, N. V. and Sudhof, T. C. (2008). "Unusually rapid evolution of Neurologin-4 in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(17): 6421-6426.

Bonnet, M. H. and Arand, D. L. (2003). "Clinical effects of sleep fragmentation versus sleep deprivation." Sleep Med Rev **7**(4): 297-310.

Borbely, A. A. (1982). "A two process model of sleep regulation." Hum Neurobiol **1**(3): 195-204.

Borbely, A. A. and Achermann, P. (1999). "Sleep homeostasis and models of sleep regulation." J Biol Rhythms **14**(6): 557-568.

Borbely, A. A., Achermann, P., Trachsel, L. and Tobler, I. (1989). "Sleep initiation and initial sleep intensity: interactions of homeostatic and circadian mechanisms." J Biol Rhythms **4**(2): 149-160.

Borbely, A. A., Baumann, F., Brandeis, D., Strauch, I. and Lehmann, D. (1981). "Sleep deprivation: effect on sleep stages and EEG power density in man." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **51**(5): 483-495.

Born, J., Rasch, B. and Gais, S. (2006). "Sleep to remember." Neuroscientist **12**(5): 410-424.

Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P. and Sudhof, T. C. (2005). "A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins." Neuron **48**(2): 229-236.

Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M. and Pasquale, E. B. (2007). "The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways." J Cell Biol **178**(7): 1295-1307.

Bouvier, D., Corera, A. T., Tremblay, M. E., Riad, M., Chagnon, M., Murai, K. K., Pasquale, E. B., Fon, E. A. and Doucet, G. (2008). "Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain." J Neurochem **106**(2): 682-695.

Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E. and McCarley, R. W. (2012). "Control of sleep and wakefulness." Physiol Rev **92**(3): 1087-1187.

Brown, T. M. and Piggins, H. D. (2007). "Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock." Prog Neurobiol **82**(5): 229-255.

Bruckner, K., Pablo Labrador, J., Scheiffele, P., Herb, A., Seeburg, P. H. and Klein, R. (1999). "EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains." Neuron **22**(3): 511-524.

Budreck, E. C., Kwon, O. B., Jung, J. H., Baudouin, S., Thommen, A., Kim, H. S., Fukazawa, Y., Harada, H., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Scheiffele, P. and Kim, J. H. (2013). "Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(2): 725-730.

Bukalo, O. and Dityatev, A. (2012). "Synaptic cell adhesion molecules." Adv Exp Med Biol **970**: 97-128.

Burrone, J. and Murthy, V. N. (2003). "Synaptic gain control and homeostasis." Curr Opin Neurobiol **13**(5): 560-567.

Buzsaki, G. (1998). "Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective." J Sleep Res **7 Suppl 1**: 17-23.

Buzsaki, G., Anastassiou, C. A. and Koch, C. (2012). "The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes." Nat Rev Neurosci **13**(6): 407-420.

Buzsaki, G. and Chrobak, J. J. (1995). "Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks." Curr Opin Neurobiol **5**(4): 504-510.

Campbell, I. G. (2009). "EEG recording and analysis for sleep research." Curr Protoc Neurosci **Chapter 10**: Unit10 12.

Campbell, I. G. and Feinberg, I. (1996a). "Noncompetitive NMDA channel blockade during waking intensely stimulates NREM delta." J Pharmacol Exp Ther **276**(2): 737-742.

Campbell, I. G. and Feinberg, I. (1996b). "NREM delta stimulation following MK-801 is a response of sleep systems." J Neurophysiol **76**(6): 3714-3720.

Campbell, I. G., Guinan, M. J. and Horowitz, J. M. (2002). "Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices." J Neurophysiol **88**(2): 1073-1076.

Campbell, S. S. and Tobler, I. (1984). "Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny." Neurosci Biobehav Rev **8**(3): 269-300.

Carmona, M. A., Murai, K. K., Wang, L., Roberts, A. J. and Pasquale, E. B. (2009). "Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12524-12529.

Carrier, J., Viens, I., Poirier, G., Robillard, R., Lafortune, M., Vandewalle, G., Martin, N., Barakat, M., Paquet, J. and Filipini, D. (2011). "Sleep slow wave changes during the middle years of life." Eur J Neurosci **33**(4): 758-766.

Carskadon, M., Dement, WC. (2011). Monitoring and staging human sleep. Principles and practice of sleep medicine. R. T. Kryger MH, Dement WC. pp 16-26.

Carskadon, M. A. and Dement, W. C. (1980). "Distribution of REM sleep on a 90 minute sleep-wake schedule." Sleep **2**(3): 309-317.

Chen, C., Hardy, M., Zhang, J., LaHoste, G. J. and Bazan, N. G. (2006). "Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments." Biochem Biophys Res Commun **340**(2): 435-440.

Chen, J. Y., Chauvette, S., Skorheim, S., Timofeev, I. and Bazhenov, M. (2012). "Interneuron-mediated inhibition synchronizes neuronal activity during slow oscillation." J Physiol **590**(Pt 16): 3987-4010.

Chen, L., MacMillan, A. M., Chang, W., Ezaz-Nikpay, K., Lane, W. S. and Verdine, G. L. (1991). "Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase." Biochemistry **30**(46): 11018-11025.

Chen, L. and Yang, G. (2015). "Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system." Front Pharmacol **6**: 71.

Chen, Y., Fu, A. K. and Ip, N. Y. (2012). "Eph receptors at synapses: implications in neurodegenerative diseases." Cell Signal **24**(3): 606-611.

Chih, B., Afridi, S. K., Clark, L. and Scheiffele, P. (2004). "Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins." Hum Mol Genet **13**(14): 1471-1477.

Chih, B., Engelman, H. and Scheiffele, P. (2005). "Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins." Science **307**(5713): 1324-1328.

Chih, B., Gollan, L. and Scheiffele, P. (2006). "Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex." Neuron **51**(2): 171-178.

Chou, T. C., Scammell, T. E., Gooley, J. J., Gaus, S. E., Saper, C. B. and Lu, J. (2003). "Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms." J Neurosci **23**(33): 10691-10702.

Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R. and Sudhof, T. C. (2007). "Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2." Neuron **54**(6): 919-931.

Chun, L. E., Woodruff, E. R., Morton, S., Hinds, L. R. and Spencer, R. L. (2015). "Variations in Phase and Amplitude of Rhythmic Clock Gene Expression across Prefrontal Cortex, Hippocampus, Amygdala, and Hypothalamic Paraventricular and Suprachiasmatic Nuclei of Male and Female Rats." J Biol Rhythms.

Colwell, C. S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X. and Waschek, J. A. (2003). "Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(5): R939-949.

Comoletti, D., De Jaco, A., Jennings, L. L., Flynn, R. E., Gaietta, G., Tsigelny, I., Ellisman, M. H. and Taylor, P. (2004). "The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing." J Neurosci **24**(20): 4889-4893.

Cortes-Mendoza, J., Diaz de Leon-Guerrero, S., Pedraza-Alva, G. and Perez-Martinez, L. (2013). "Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription." Int J Dev Neurosci **31**(6): 359-369.

Costa-Mattioli, M. and Sonenberg, N. (2008). "Translational control of gene expression: a molecular switch for memory storage." Prog Brain Res **169**: 81-95.

Cotman, C. W., Hailer, N. P., Pfister, K. K., Soltesz, I. and Schachner, M. (1998). "Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations?" Prog Neurobiol **55**(6): 659-669.

Curie, T., Mongrain, V., Dorsaz, S., Mang, G. M., Emmenegger, Y. and Franken, P. (2013). "Homeostatic and circadian contribution to EEG and molecular state variables of sleep regulation." Sleep **36**(3): 311-323.

Czeisler, C. A., Weitzman, E., Moore-Ede, M. C., Zimmerman, J. C. and Knauer, R. S. (1980). "Human sleep: its duration and organization depend on its circadian phase." Science **210**(4475): 1264-1267.

Daan, S., Beersma, D. G. and Borbely, A. A. (1984). "Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker." Am J Physiol **246**(2 Pt 2): R161-183.

Dahlhaus, R., Hines, R. M., Eadie, B. D., Kannangara, T. S., Hines, D. J., Brown, C. E., Christie, B. R. and El-Husseini, A. (2010). "Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus." Hippocampus **20**(2): 305-322.

Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W. and Greenberg, M. E. (2000). "EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation." Cell **103**(6): 945-956.

Danielson, E., Zhang, N., Metallo, J., Kaleka, K., Shin, S. M., Gerges, N. and Lee, S. H. (2012). "S-SCAM/MAGI-2 is an essential synaptic scaffolding molecule for the GluA2-containing maintenance pool of AMPA receptors." J Neurosci **32**(20): 6967-6980.

Dash, M. B., Douglas, C. L., Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C. and Tononi, G. (2009). "Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states." J Neurosci **29**(3): 620-629.

Datta, S. and Hobson, J. A. (1995). "Suppression of ponto-geniculo-occipital waves by neurotoxic lesions of pontine caudo-lateral peribrachial cells." Neuroscience **67**(3): 703-712.

Datta, S. and Siwek, D. F. (1997). "Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep." J Neurophysiol **77**(6): 2975-2988.

Davy, A., Gale, N. W., Murray, E. W., Klinghoffer, R. A., Soriano, P., Feuerstein, C. and Robbins, S. M. (1999). "Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion." Genes Dev **13**(23): 3125-3135.

Davy, A. and Robbins, S. M. (2000). "Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner." EMBO J **19**(20): 5396-5405.

Deboer, T., Vansteensel, M. J., Detari, L. and Meijer, J. H. (2003). "Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons." Nat Neurosci **6**(10): 1086-1090.

Deininger, K., Eder, M., Kramer, E. R., Zieglgansberger, W., Dodt, H. U., Dornmair, K., Colicelli, J. and Klein, R. (2008). "The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12539-12544.

Denton, C. P., Khan, K., Hoyles, R. K., Shiwen, X., Leoni, P., Chen, Y., Eastwood, M. and Abraham, D. J. (2009). "Inducible lineage-specific deletion of TbetaRII in fibroblasts defines a pivotal regulatory role during adult skin wound healing." J Invest Dermatol **129**(1): 194-204.

Deurveilher, S. and Semba, K. (2005). "Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state." Neuroscience **130**(1): 165-183.

Diaz-Ruiz, O., Navarro, L., Mendez-Diaz, M., Galicia, O., Elder, J. H., Sanna, P. P., Drucker-Colin, R. and Prospero-Garcia, O. (2001). "Inhibition of the ERK pathway prevents HIVgp120-induced REM sleep increase." Brain Res **913**(1): 78-81.

Diekelmann, S. and Born, J. (2010). "The memory function of sleep." Nat Rev Neurosci **11**(2): 114-126.

Dijk, D. J., Beersma, D. G. and Daan, S. (1987). "EEG power density during nap sleep: reflection of an hourglass measuring the duration of prior wakefulness." J Biol Rhythms **2**(3): 207-219.

Dijk, D. J. and Czeisler, C. A. (1994). "Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans." Neurosci Lett **166**(1): 63-68.

Dijk, D. J. and Czeisler, C. A. (1995). "Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3526-3538.

Dijk, D. J., Duffy, J. F. and Czeisler, C. A. (1992). "Circadian and sleep/wake dependent aspects of subjective alertness and cognitive performance." J Sleep Res **1**(2): 112-117.

Dijk, D. J., Hayes, B. and Czeisler, C. A. (1993). "Dynamics of electroencephalographic sleep spindles and slow wave activity in men: effect of sleep deprivation." Brain Res **626**(1-2): 190-199.

Dijk, D. J. and Lockley, S. W. (2002). "Integration of human sleep-wake regulation and circadian rhythmicity." J Appl Physiol (1985) **92**(2): 852-862.

Dijk, D. J., Shanahan, T. L., Duffy, J. F., Ronda, J. M. and Czeisler, C. A. (1997). "Variation of electroencephalographic activity during non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep with phase of circadian melatonin rhythm in humans." J Physiol **505 (Pt 3)**: 851-858.

Dines, M., Grinberg, S., Vassiliev, M., Ram, A., Tamir, T. and Lamprecht, R. (2015). "The roles of Eph receptors in contextual fear conditioning memory formation." Neurobiol Learn Mem.

Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P. F., Murphy, M., Kontgen, F. and Boyd, A. W. (1998). "EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13248-13253.

Drake, C. L., Roehrs, T. A., Royer, H., Koshorek, G., Turner, R. B. and Roth, T. (2000). "Effects of an experimentally induced rhinovirus cold on sleep, performance, and daytime alertness." Physiol Behav **71**(1-2): 75-81.

Dworak, M., McCarley, R. W., Kim, T., Kalinchuk, A. V. and Basheer, R. (2010). "Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep." J Neurosci **30**(26): 9007-9016.

Eckel-Mahan, K. L., Phan, T., Han, S., Wang, H., Chan, G. C., Scheiner, Z. S. and Storm, D. R. (2008). "Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAmp: implications for memory persistence." Nat Neurosci **11**(9): 1074-1082.

El Helou, J., Belanger-Nelson, E., Freyburger, M., Dorsaz, S., Curie, T., La Spada, F., Gaudreault, P. O., Beaumont, E., Pouliot, P., Lesage, F., Frank, M. G., Franken, P. and Mongrain, V. (2013). "Neuroigin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): 9974-9979.

Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J. and Traynelis, S. F. (2005). "Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles." J Physiol **563**(Pt 2): 345-358.

Esser, S. K., Hill, S. L. and Tononi, G. (2007). "Sleep homeostasis and cortical synchronization: I. Modeling the effects of synaptic strength on sleep slow waves." Sleep **30**(12): 1617-1630.

Ethell, I. M. and Pasquale, E. B. (2005). "Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling." Prog Neurobiol **75**(3): 161-205.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.

Fang, J., Wang, Y. and Krueger, J. M. (1997). "Mice lacking the TNF 55 kDa receptor fail to sleep more after TNF α treatment." J Neurosci **17**(15): 5949-5955.

Farias, G. G., Alfaro, I. E., Cerpa, W., Grabowski, C. P., Godoy, J. A., Bonansco, C. and Inestrosa, N. C. (2009). "Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons." J Biol Chem **284**(23): 15857-15866.

Feil, R. and Fraga, M. F. (2011). "Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications." Nat Rev Genet **13**(2): 97-109.

Feinberg, I., Maloney, T. and March, J. D. (1992). "Precise conservation of NREM period 1 (NREMP1) delta across naps and nocturnal sleep: implications for REM latency and NREM/REM alternation." Sleep **15**(5): 400-403.

Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Silva, A. J. and Fan, G. (2010). "Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons." Nat Neurosci **13**(4): 423-430.

Fields, R. D. and Itoh, K. (1996). "Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity." Trends Neurosci **19**(11): 473-480.

Filosa, A., Paixao, S., Honsek, S. D., Carmona, M. A., Becker, L., Feddersen, B., Gaitanos, L., Rudhard, Y., Schoepfer, R., Klopstock, T., Kullander, K., Rose, C. R., Pasquale, E. B. and Klein, R. (2009). "Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport." Nat Neurosci **12**(10): 1285-1292.

Finelli, L. A., Baumann, H., Borbely, A. A. and Achermann, P. (2000). "Dual electroencephalogram markers of human sleep homeostasis: correlation between theta activity in waking and slow-wave activity in sleep." Neuroscience **101**(3): 523-529.

Fogel, S. M., Smith, C. T. and Cote, K. A. (2007). "Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems." Behav Brain Res **180**(1): 48-61.

Frank, M. G. (2012). "Erasing synapses in sleep: is it time to be SHY?" Neural Plast **2012**: 264378.

Franken, P. (2013). "A role for clock genes in sleep homeostasis." Curr Opin Neurobiol **23**(5): 864-872.

Franken, P., Chollet, D. and Tafti, M. (2001). "The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control." J Neurosci **21**(8): 2610-2621.

Franken, P., Dijk, D. J., Tobler, I. and Borbely, A. A. (1991). "Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature." Am J Physiol **261**(1 Pt 2): R198-208.

Franken, P., Dudley, C. A., Estill, S. J., Barakat, M., Thomason, R., O'Hara, B. F. and McKnight, S. L. (2006). "NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: genotype and sex interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7118-7123.

Franken, P., Malafosse, A. and Tafti, M. (1998). "Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice." Am J Physiol **275**(4 Pt 2): R1127-1137.

Franken, P., Malafosse, A. and Tafti, M. (1999). "Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice." Sleep **22**(2): 155-169.

Franken, P., Thomason, R., Heller, H. C. and O'Hara, B. F. (2007). "A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: a strain comparison." BMC Neurosci **8**: 87.

Fu, A. K., Hung, K. W., Fu, W. Y., Shen, C., Chen, Y., Xia, J., Lai, K. O. and Ip, N. Y. (2011). "APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity." Nat Neurosci **14**(2): 181-189.

Fu, A. K., Hung, K. W., Huang, H., Gu, S., Shen, Y., Cheng, E. Y., Ip, F. C., Huang, X., Fu, W. Y. and Ip, N. Y. (2014). "Blockade of EphA4 signaling ameliorates hippocampal synaptic dysfunctions in mouse models of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(27): 9959-9964.

Fu, W. Y., Chen, Y., Sahin, M., Zhao, X. S., Shi, L., Bikoff, J. B., Lai, K. O., Yung, W. H., Fu, A. K., Greenberg, M. E. and Ip, N. Y. (2007). "Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism." Nat Neurosci **10**(1): 67-76.

Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K. and Inokuchi, K. (2003). "Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo." Neuron **38**(3): 447-460.

Gais, S., Albouy, G., Boly, M., Dang-Vu, T. T., Darsaud, A., Desseilles, M., Rauchs, G., Schabus, M., Sterpenich, V., Vandewalle, G., Maquet, P. and Peigneux, P. (2007). "Sleep transforms the cerebral trace of declarative memories." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18778-18783.

Gais, S., Molle, M., Helms, K. and Born, J. (2002). "Learning-dependent increases in sleep spindle density." J Neurosci **22**(15): 6830-6834.

Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D. G., Pawson, T., Davis, S. and Yancopoulos, G. D. (1996). "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis." Neuron **17**(1): 9-19.

Gallopin, T., Luppi, P. H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B. and 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. and Saper, C. B. (2002). "Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species." Neuroscience **115**(1): 285-294.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S. and Weitz, C. J. (1998). "Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism." Science **280**(5369): 1564-1569.

Gerashchenko, D., Blanco-Centurion, C., Greco, M. A. and Shiromani, P. J. (2003). "Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin-2-saporin on sleep in Long-Evans rats." Neuroscience **116**(1): 223-235.

Girardet, C., Blanchard, M. P., Ferracci, G., Leveque, C., Moreno, M., Francois-Bellan, A. M., Becquet, D. and Bosler, O. (2010). "Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents." Eur J Neurosci **31**(2): 359-370.

Gkogkas, C. G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D. B., Vasuta, C., Yee, S., Truitt, M., Dallaire, P., Major, F., Lasko, P., Ruggero, D., Nader, K., Lacaille, J. C. and Sonenberg, N. (2013). "Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control." Nature **493**(7432): 371-377.

Goldsmith, C. S. and Bell-Pedersen, D. (2013). "Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks." Adv Genet **84**: 1-39.

Golomb, D., Shedmi, A., Curtu, R. and Ermentrout, G. B. (2006). "Persistent synchronized bursting activity in cortical tissues with low magnesium concentration: a modeling study." J Neurophysiol **95**(2): 1049-1067.

Gonzalez-Billault, C., Munoz-Llancao, P., Henriquez, D. R., Wojnacki, J., Conde, C. and Caceres, A. (2012). "The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity." Cytoskeleton (Hoboken) **69**(7): 464-485.

Graff, J., Woldemichael, B. T., Berchtold, D., Dewarrat, G. and Mansuy, I. M. (2012). "Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation." Nat Commun **3**: 991.

Graves, L. A., Heller, E. A., Pack, A. I. and Abel, T. (2003). "Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning." Learn Mem **10**(3): 168-176.

Greenwood, M. P., Mecawi, A. S., Hoe, S. Z., Mustafa, M. R., Johnson, K. R., Al-Mahmoud, G. A., Elias, L. L., Paton, J. F., Antunes-Rodrigues, J., Gainer, H., Murphy, D. and Hindmarch, C. C. (2015). "A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **308**(7): R559-568.

Greferath, U., Canty, A. J., Messenger, J. and Murphy, M. (2002). "Developmental expression of EphA4-tyrosine kinase receptor in the mouse brain and spinal cord." Mech Dev **119** **Suppl 1**: S231-238.

Grunwald, I. C., Korte, M., Adelman, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R. H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T. and Klein, R. (2004). "Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs." Nat Neurosci **7**(1): 33-40.

Guan, Z., Peng, X. and Fang, J. (2004). "Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus." Brain Res **1018**(1): 38-47.

Gunschmann, C., Chiticariu, E., Garg, B., Hiz, M. M., Mostmans, Y., Wehner, M. and Scharfenberger, L. (2014). "Transgenic mouse technology in skin biology: inducible gene knockout in mice." J Invest Dermatol **134**(7): e22.

Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M. H., Bonaguidi, M. A., Balazer, J. A., Eaves, H. L., Xie, B., Ford, E., Zhang, K., Ming, G. L., Gao, Y. and Song, H. (2011a). "Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain." Nat Neurosci **14**(10): 1345-1351.

Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L. and Song, H. (2011b). "Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain." Cell **145**(3): 423-434.

Guzman-Karlsson, M. C., Meadows, J. P., Gavin, C. F., Hablitz, J. J. and Sweatt, J. D. (2014). "Transcriptional and epigenetic regulation of Hebbian and non-Hebbian plasticity." Neuropharmacology **80**: 3-17.

Haapasalo, A., Kim, D. Y., Carey, B. W., Turunen, M. K., Pettingell, W. H. and Kovacs, D. M. (2007). "Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage regulates association of leukocyte-common antigen-related (LAR) receptor tyrosine phosphatase with beta-catenin." J Biol Chem **282**(12): 9063-9072.

Hall, A. (2012). "Rho family GTPases." Biochem Soc Trans **40**(6): 1378-1382.

Harmar, A. J., Marston, H. M., Shen, S., Spratt, C., West, K. M., Sheward, W. J., Morrison, C. F., Dorin, J. R., Piggins, H. D., Reubi, J. C., Kelly, J. S., Maywood, E. S. and Hastings, M. H. (2002).

"The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei." Cell **109**(4): 497-508.

Harsch, A. and Robinson, H. P. (2000). "Postsynaptic variability of firing in rat cortical neurons: the roles of input synchronization and synaptic NMDA receptor conductance." J Neurosci **20**(16): 6181-6192.

Hastings, M. H. and Herzog, E. D. (2004). "Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei." J Biol Rhythms **19**(5): 400-413.

Hay, N. and Sonenberg, N. (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.

He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C. X., Zhang, K., He, C. and Xu, G. L. (2011). "Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA." Science **333**(6047): 1303-1307.

Hebb, D. O. (1949). Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory. New York.

Herz, J. and Chen, Y. (2006). "Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **7**(11): 850-859.

Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K. and Nakata, Y. (2000). "Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia." J Neurochem **75**(3): 965-972.

Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. A., Jeffrey, P. D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D. A., Boyd, A. W., Henkemeyer, M. and Nikolov, D. B. (2004). "Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling." Nat Neurosci **7**(5): 501-509.

Himanen, J. P. and Nikolov, D. B. (2003). "Eph signaling: a structural view." Trends Neurosci **26**(1): 46-51.

Himanen, J. P., Saha, N. and Nikolov, D. B. (2007). "Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins." Curr Opin Cell Biol **19**(5): 534-542.

Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. and Takaku, F. (1987). "A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene." Science **238**(4834): 1717-1720.

Hirao, K., Hata, Y., Ide, N., Takeuchi, M., Irie, M., Yao, I., Deguchi, M., Toyoda, A., Sudhof, T. C. and Takai, Y. (1998). "A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins." J Biol Chem **273**(33): 21105-21110.

Hoeffler, C. A. and Klann, E. (2010). "mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease." Trends Neurosci **33**(2): 67-75.

Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M. and Sheng, M. (2005). "GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking." Nat Neurosci **8**(7): 906-915.

Hu, W. P., Li, J. D., Colwell, C. S. and Zhou, Q. Y. (2011). "Decreased REM sleep and altered circadian sleep regulation in mice lacking vasoactive intestinal polypeptide." Sleep **34**(1): 49-56.

Huai, J. and Drescher, U. (2001). "An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein." J Biol Chem **276**(9): 6689-6694.

Ibata, Y., Takahashi, Y., Okamura, H., Kawakami, F., Terubayashi, H., Kubo, T. and Yanaihara, N. (1989). "Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection." Neurosci Lett **97**(1-2): 1-5.

Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C. and Sudhof, T. C. (1995). "Neurologin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins." Cell **81**(3): 435-443.

Ichtchenko, K., Nguyen, T. and Sudhof, T. C. (1996). "Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins." J Biol Chem **271**(5): 2676-2682.

Iida, J., Hirabayashi, S., Sato, Y. and Hata, Y. (2004). "Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin." Mol Cell Neurosci **27**(4): 497-508.

Iida, K. and Nishimura, I. (2002). "Gene expression profiling by DNA microarray technology." Crit Rev Oral Biol Med **13**(1): 35-50.

Ikeda, M., Sugiyama, T., Wallace, C. S., Gompf, H. S., Yoshioka, T., Miyawaki, A. and Allen, C. N. (2003). "Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons." Neuron **38**(2): 253-263.

Inouye, S. T. and Kawamura, H. (1979). "Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5962-5966.

Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T. W. and Sudhof, T. C. (1997). "Binding of neuroligins to PSD-95." Science **277**(5331): 1511-1515.

Isacu, D. (2012). Thèse de doctorat : "Rôle du récepteur EphA4 dans la plasticité structurale neuro-no-gliale du noyau supraoptique à la suite d'un régime à l'eau salée". Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal.

Ishida, N., Matsui, M., Mitsui, Y. and Mishina, M. (1994). "Circadian expression of NMDA receptor mRNAs, epsilon 3 and zeta 1, in the suprachiasmatic nucleus of rat brain." Neurosci Lett **166**(2): 211-215.

Ishikawa, A., Kanayama, Y., Matsumura, H., Tsuchimochi, H., Ishida, Y. and Nakamura, S. (2006). "Selective rapid eye movement sleep deprivation impairs the maintenance of long-term potentiation in the rat hippocampus." Eur J Neurosci **24**(1): 243-248.

Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. and Zhang, Y. (2010). "Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification." Nature **466**(7310): 1129-1133.

Iyer, R., Wang, T. A. and Gillette, M. U. (2014). "Circadian gating of neuronal functionality: a basis for iterative metaplasticity." Front Syst Neurosci **8**: 164.

Jagannath, A., Peirson, S. N. and Foster, R. G. (2013). "Sleep and circadian rhythm disruption in neuropsychiatric illness." Curr Opin Neurobiol **23**(5): 888-894.

Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T. and Paris Autism Research International Sibpair, S. (2003). "Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism." Nat Genet **34**(1): 27-29.

Jedlicka, P., Vnencak, M., Krueger, D. D., Jungenitz, T., Brose, N. and Schwarzacher, S. W. (2015). "Neuroligin-1 regulates excitatory synaptic transmission, LTP and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus in vivo." Brain Struct Funct **220**(1): 47-58.

Jimenez-Anguiano, A., Baez-Saldana, A. and Drucker-Colin, R. (1993). "Cerebrospinal fluid (CSF) extracted immediately after REM sleep deprivation prevents REM rebound and contains vasoactive intestinal peptide (VIP)." Brain Res **631**(2): 345-348.

Jin, S. G., Wu, X., Li, A. X. and Pfeifer, G. P. (2011). "Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain." Nucleic Acids Res **39**(12): 5015-5024.

Jouvet, M. (1965a). "[The paradoxical phase of sleep]." Int J Neurol **5**(2): 131-150.

Jouvet, M. (1965b). "Paradoxical Sleep--a Study of Its Nature and Mechanisms." Prog Brain Res **18**: 20-62.

Jouvet, M. (1972). "The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle." Ergeb Physiol **64**: 166-307.

Jung, S. Y., Kim, J., Kwon, O. B., Jung, J. H., An, K., Jeong, A. Y., Lee, C. J., Choi, Y. B., Bailey, C. H., Kandel, E. R. and Kim, J. H. (2010). "Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(10): 4710-4715.

Kalinchuk, A. V., McCarley, R. W., Porkka-Heiskanen, T. and Basheer, R. (2011). "The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade." J Neurochem **116**(2): 260-272.

Karpova, A., Bar, J. and Kreutz, M. R. (2012). "Long-distance signaling from synapse to nucleus via protein messengers." Adv Exp Med Biol **970**: 355-376.

Kayser, M. S., McClelland, A. C., Hughes, E. G. and Dalva, M. B. (2006). "Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors." J Neurosci **26**(47): 12152-12164.

Khare, T., Pai, S., Koncevicius, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., Irimia, M., Jia, P., Ptak, C., Xia, M., Tice, R., Tochigi, M., Morera, S., Nazarians, A., Belsham, D., Wong, A. H., Blencowe, B. J., Wang, S. C., Kapranov, P., Kustra, R., Labrie, V., Klimasauskas, S. and Petronis, A. (2012). "5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary." Nat Struct Mol Biol **19**(10): 1037-1043.

Khvotchev, M. V., Ren, M., Takamori, S., Jahn, R. and Sudhof, T. C. (2003). "Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis." J Neurosci **23**(33): 10531-10539.

Kim, E. and Sheng, M. (2004). "PDZ domain proteins of synapses." Nat Rev Neurosci **5**(10): 771-781.

Kim, J., Jung, S. Y., Lee, Y. K., Park, S., Choi, J. S., Lee, C. J., Kim, H. S., Choi, Y. B., Scheiffele, P., Bailey, C. H., Kandel, E. R. and Kim, J. H. (2008). "Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9087-9092.

Kirschstein, T. and Kohling, R. (2009). "What is the source of the EEG?" Clin EEG Neurosci **40**(3): 146-149.

Klein, R. (2009). "Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling." Nat Neurosci **12**(1): 15-20.

Klerman, E. B., Gershengorn, H. B., Duffy, J. F. and Kronauer, R. E. (2002). "Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker." J Biol Rhythms **17**(2): 181-193.

Knoblauch, V., Krauchi, K., Renz, C., Wirz-Justice, A. and Cajochen, C. (2002). "Homeostatic control of slow-wave and spindle frequency activity during human sleep: effect of differential sleep pressure and brain topography." Cereb Cortex **12**(10): 1092-1100.

Knoblauch, V., Martens, W., Wirz-Justice, A., Krauchi, K. and Cajochen, C. (2003). "Regional differences in the circadian modulation of human sleep spindle characteristics." Eur J Neurosci **18**(1): 155-163.

Knowles, J. B., Coulter, M., Wahnou, S., Reitz, W. and MacLean, A. W. (1990). "Variation in process S: effects on sleep continuity and architecture." Sleep **13**(2): 97-107.

Kong, J., Shepel, P. N., Holden, C. P., Mackiewicz, M., Pack, A. I. and Geiger, J. D. (2002). "Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep." J Neurosci **22**(13): 5581-5587.

Kopp, C., Longordo, F., Nicholson, J. R. and Luthi, A. (2006). "Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function." J Neurosci **26**(48): 12456-12465.

Kornau, H. C., Seeburg, P. H. and Kennedy, M. B. (1997). "Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 368-373.

Krout, K. E., Belzer, R. E. and Loewy, A. D. (2002). "Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat." J Comp Neurol **448**(1): 53-101.

Krueger, J. M. (2008). "The role of cytokines in sleep regulation." Curr Pharm Des **14**(32): 3408-3416.

Krueger, J. M., Rector, D. M., Roy, S., Van Dongen, H. P., Belenky, G. and Panksepp, J. (2008). "Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies." Nat Rev Neurosci **9**(12): 910-919.

Kruisbrink, J., Mirmiran, M., Van der Woude, T. P. and Boer, G. J. (1987). "Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat." Brain Res **419**(1-2): 76-86.

Krystal, A. D. (2012). "Psychiatric disorders and sleep." Neurol Clin **30**(4): 1389-1413.

Kulis, M., Queiros, A. C., Beekman, R. and Martin-Subero, J. I. (2013). "Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer." Biochim Biophys Acta **1829**(11): 1161-1174.

Kullander, K. and Klein, R. (2002). "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 475-486.

Kwon, H. B., Kozorovitskiy, Y., Oh, W. J., Peixoto, R. T., Akhtar, N., Saulnier, J. L., Gu, C. and Sabatini, B. L. (2012). "Neuroigin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number." Nat Neurosci **15**(12): 1667-1674.

Lamarre, Y., Fillion, M. and Cordeau, J. P. (1971). "Neuronal discharges of the ventrolateral nucleus of the thalamus during sleep and wakefulness in the cat. I. Spontaneous activity." Exp Brain Res **12**(5): 480-498.

Landolt, H. P., Dijk, D. J., Achermann, P. and Borbely, A. A. (1996). "Effect of age on the sleep EEG: slow-wave activity and spindle frequency activity in young and middle-aged men." Brain Res **738**(2): 205-212.

Landolt, H. P., Finelli, L. A., Roth, C., Buck, A., Achermann, P. and Borbely, A. A. (2000). "Zolpidem and sleep deprivation: different effect on EEG power spectra." J Sleep Res **9**(2): 175-183.

Landolt, H. P., Retey, J. V., Tonz, K., Gottselig, J. M., Khatami, R., Buckelmuller, I. and Achermann, P. (2004). "Caffeine attenuates waking and sleep electroencephalographic markers of sleep homeostasis in humans." Neuropsychopharmacology **29**(10): 1933-1939.

Lange, T., Perras, B., Fehm, H. L. and Born, J. (2003). "Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination." Psychosom Med **65**(5): 831-835.

Laposky, A., Easton, A., Dugovic, C., Walisser, J., Bradfield, C. and Turek, F. (2005). "Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation." Sleep **28**(4): 395-409.

Lavie, P. (2001). "Sleep-wake as a biological rhythm." Annu Rev Psychol **52**: 277-303.

Lemieux, M., Chauvette, S. and Timofeev, I. (2015). "Neocortical inhibitory activities and long-range afferents contribute to the synchronous onset of silent states of the neocortical slow oscillation." J Neurophysiol **113**(3): 768-779.

Levenson, J. M., Qiu, S. and Weeber, E. J. (2008). "The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene." Biochim Biophys Acta **1779**(8): 422-431.

Levenson, J. M., Roth, T. L., Lubin, F. D., Miller, C. A., Huang, I. C., Desai, P., Malone, L. M. and Sweatt, J. D. (2006). "Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus." J Biol Chem **281**(23): 15763-15773.

Levinson, J. N. and El-Husseini, A. (2005). "Building excitatory and inhibitory synapses: balancing neuroligin partnerships." Neuron **48**(2): 171-174.

Li, Q., Lee, J. A. and Black, D. L. (2007). "Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing." Nat Rev Neurosci **8**(11): 819-831.

Li, W. and Liu, M. (2011). "Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues." J Nucleic Acids **2011**: 870726.

Li, Y., Zhou, Z., Zhang, X., Tong, H., Li, P., Zhang, Z. C., Jia, Z., Xie, W. and Han, J. (2013). "Drosophila neuroligin 4 regulates sleep through modulating GABA transmission." J Neurosci **33**(39): 15545-15554.

Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M. and Parada, L. F. (2003). "mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system." J Neurosci Res **71**(1): 7-22.

Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghghi, F. G., Sejnowski, T. J., Behrens, M. M. and Ecker, J. R. (2013). "Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development." Science **341**(6146): 1237905.

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

Lowrey, P. L. and Takahashi, J. S. (2011). "Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms." Adv Genet **74**: 175-230.

Lu, B. (2003). "Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation." Neuron **39**(5): 735-738.

Lu, B. and Figurov, A. (1997). "Role of neurotrophins in synapse development and plasticity." Rev Neurosci **8**(1): 1-12.

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

Lubin, F. D., Roth, T. L. and Sweatt, J. D. (2008). "Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory." J Neurosci **28**(42): 10576-10586.

Lucero, M. A. (1970). "Lengthening of REM sleep duration consecutive to learning in the rat." Brain Res **20**(2): 319-322.

Luo, J., Phan, T. X., Yang, Y., Garelick, M. G. and Storm, D. R. (2013). "Increases in cAMP, MAPK activity, and CREB phosphorylation during REM sleep: implications for REM sleep and memory consolidation." J Neurosci **33**(15): 6460-6468.

Mackiewicz, M., Naidoo, N., Zimmerman, J. E. and Pack, A. I. (2008). "Molecular mechanisms of sleep and wakefulness." Ann N Y Acad Sci **1129**: 335-349.

Mackiewicz, M., Zimmerman, J. E., Shockley, K. R., Churchill, G. A. and Pack, A. I. (2009). "What are microarrays teaching us about sleep?" Trends Mol Med **15**(2): 79-87.

Mackowiak, M., Mordalska, P. and Wedzony, K. (2014). "Neuroligins, synapse balance and neuropsychiatric disorders." Pharmacol Rep **66**(5): 830-835.

Maiti, A. and Drohat, A. C. (2011). "Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites." J Biol Chem **286**(41): 35334-35338.

Malinow, R. and Malenka, R. C. (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **25**: 103-126.

Mang, G. M. and Franken, P. (2015). "Genetic dissection of sleep homeostasis." Curr Top Behav Neurosci **25**: 25-63.

Maret, S., Dorsaz, S., Gurcel, L., Pradervand, S., Petit, B., Pfister, C., Hagenbuchle, O., O'Hara, B. F., Franken, P. and Tafti, M. (2007). "Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 20090-20095.

Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G. and Sun, Y. E. (2003). "DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation." Science **302**(5646): 890-893.

Massart, R., Freyburger, M., Suderman, M., Paquet, J., El Helou, J., Belanger-Nelson, E., Rachalski, A., Koumar, O. C., Carrier, J., Szyf, M. and Mongrain, V. (2014). "The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes." Transl Psychiatry **4**: e347.

Matus, A. (2000). "Actin-based plasticity in dendritic spines." Science **290**(5492): 754-758.

Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., Johnson, B. E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V. M., Rowitch, D. H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S. J., Haussler, D., Marra, M. A., Hirst, M., Wang, T. and Costello, J. F. (2010). "Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters." Nature **466**(7303): 253-257.

Maussion, G., Yang, J., Suderman, M., Diallo, A., Nagy, C., Arnovitz, M., Mechawar, N. and Turecki, G. (2014). "Functional DNA methylation in a transcript specific 3'UTR region of TrkB associates with suicide." Epigenetics **9**(8): 1061-1070.

McCarley, R. W., Benoit, O. and Barrionuevo, G. (1983). "Lateral geniculate nucleus unitary discharge in sleep and waking: state- and rate-specific aspects." J Neurophysiol **50**(4): 798-818.

McDermott, C. M., Hardy, M. N., Bazan, N. G. and Magee, J. C. (2006). "Sleep deprivation-induced alterations in excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus." J Physiol **570**(Pt 3): 553-565.

McGowan, P. O. and Szyf, M. (2010). "The epigenetics of social adversity in early life: implications for mental health outcomes." Neurobiol Dis **39**(1): 66-72.

Mercurio, F. and Manning, A. M. (1999). "NF-kappaB as a primary regulator of the stress response." Oncogene **18**(45): 6163-6171.

Miller, C. A. and Sweatt, J. D. (2007). "Covalent modification of DNA regulates memory formation." Neuron **53**(6): 857-869.

Mirmiran, M., Kruisbrink, J., Bos, N. P., Van der Werf, D. and Boer, G. J. (1988). "Decrease of rapid-eye-movement sleep in the light by intraventricular application of a VIP-antagonist in the rat." Brain Res **458**(1): 192-194.

Missler, M., Sudhof, T. C. and Biederer, T. (2012). "Synaptic cell adhesion." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(4): a005694.

Miyamoto, Y. and Sancar, A. (1998). "Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6097-6102.

Molle, M., Yeshenko, O., Marshall, L., Sara, S. J. and Born, J. (2006). "Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep." J Neurophysiol **96**(1): 62-70.

Mongrain, V., Carrier, J., Paquet, J., Belanger-Nelson, E. and Dumont, M. (2011a). "Morning and evening-type differences in slow waves during NREM sleep reveal both trait and state-dependent phenotypes." PLoS One **6**(8): e22679.

Mongrain, V., Hernandez, S. A., Pradervand, S., Dorsaz, S., Curie, T., Hagiwara, G., Gip, P., Heller, H. C. and Franken, P. (2010). "Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis." Sleep **33**(9): 1147-1157.

Mongrain, V., La Spada, F., Curie, T. and Franken, P. (2011b). "Sleep loss reduces the DNA-binding of BMAL1, CLOCK, and NPAS2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex." PLoS One **6**(10): e26622.

Moore, R. Y. (2007). "Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation." Sleep Med **8** **Suppl 3**: 27-33.

Morin, A., Doyon, J., Dostie, V., Barakat, M., Hadj Tahar, A., Korman, M., Benali, H., Karni, A., Ungerleider, L. G. and Carrier, J. (2008). "Motor sequence learning increases sleep spindles and fast frequencies in post-training sleep." Sleep **31**(8): 1149-1156.

Morin, L. P. and Allen, C. N. (2006). "The circadian visual system, 2005." Brain Res Rev **51**(1): 1-60.

Morin, L. P., Shivers, K. Y., Blanchard, J. H. and Muscat, L. (2006). "Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus." Neuroscience **137**(4): 1285-1297.

Moruzzi, G. and Magoun, H. W. (1949). "Brain stem reticular formation and activation of the EEG." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **1**(4): 455-473.

Munoz, F. J., Godoy, J. A., Cerpa, W., Poblete, I. M., Huidobro-Toro, J. P. and Inestrosa, N. C. (2014). "Wnt-5a increases NO and modulates NMDA receptor in rat hippocampal neurons." Biochem Biophys Res Commun **444**(2): 189-194.

Munoz, P. C., Aspe, M. A., Contreras, L. S. and Palacios, A. G. (2010). "Correlations of recognition memory performance with expression and methylation of brain-derived neurotrophic factor in rats." Biol Res **43**(2): 251-258.

Munzel, M., Globisch, D., Bruckl, T., Wagner, M., Welzmler, V., Michalakakis, S., Muller, M., Biel, M. and Carell, T. (2010). "Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain." Angew Chem Int Ed Engl **49**(31): 5375-5377.

Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y. and Pasquale, E. B. (2003). "Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling." Nat Neurosci **6**(2): 153-160.

Murai, K. K. and Pasquale, E. B. (2002). "Can Eph receptors stimulate the mind?" Neuron **33**(2): 159-162.

Murai, K. K. and Pasquale, E. B. (2003). "'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2823-2832.

Murai, K. K. and Pasquale, E. B. (2004). "Eph receptors, ephrins, and synaptic function." Neuroscientist **10**(4): 304-314.

Murai, K. K. and Pasquale, E. B. (2011). "Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses." Glia **59**(11): 1567-1578.

Musiek, E. S., Xiong, D. D. and Holtzman, D. M. (2015). "Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease." Exp Mol Med **47**: e148.

Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.

Nair, D., Hosy, E., Petersen, J. D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D. and Sibarita, J. B. (2013). "Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95." J Neurosci **33**(32): 13204-13224.

Nam, C. I. and Chen, L. (2005). "Postsynaptic assembly induced by neuroligin-neurexin interaction and neurotransmitter." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6137-6142.

Nelson, E. D., Kavalali, E. T. and Monteggia, L. M. (2008). "Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation." J Neurosci **28**(2): 395-406.

Nelson, S. B. and Turrigiano, G. G. (2008). "Strength through diversity." Neuron **60**(3): 477-482.

Neuner-Jehle, M., Rhyner, T. A. and Borbely, A. A. (1995). "Sleep deprivation differentially alters the mRNA and protein levels of neurogranin in rat brain." Brain Res **685**(1-2): 143-153.

Nguyen, T. and Sudhof, T. C. (1997). "Binding properties of neuroligin 1 and neuroligin 2 reveal function as heterophilic cell adhesion molecules." J Biol Chem **272**(41): 26032-26039.

Nicoll, R. A. and Roche, K. W. (2013). "Long-term potentiation: peeling the onion." Neuropharmacology **74**: 18-22.

Nir, Y., Staba, R. J., Andrillon, T., Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Fried, I. and Tononi, G. (2011). "Regional slow waves and spindles in human sleep." Neuron **70**(1): 153-169.

Nishikawa, Y., Shibata, S. and Watanabe, S. (1995). "Circadian changes in long-term potentiation of rat suprachiasmatic field potentials elicited by optic nerve stimulation in vitro." Brain Res **695**(2): 158-162.

Nusser, Z., Lujan, R., Laube, G., Roberts, J. D., Molnar, E. and Somogyi, P. (1998). "Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus." Neuron **21**(3): 545-559.

Obal, F., Jr., Opp, M., Cady, A. B., Johannsen, L. and Krueger, J. M. (1989). "Prolactin, vasoactive intestinal peptide, and peptide histidine methionine elicit selective increases in REM sleep in rabbits." Brain Res **490**(2): 292-300.

Ohlmann, K. K. and O'Sullivan, M. I. (2009). "The costs of short sleep." AAOHN J **57**(9): 381-385; quiz 386-387.

Oyanedel, C. N., Binder, S., Kelemen, E., Petersen, K., Born, J. and Inostroza, M. (2014). "Role of slow oscillatory activity and slow wave sleep in consolidation of episodic-like memory in rats." Behav Brain Res **275**: 126-130.

Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S. and Hogenesch, J. B. (2002). "Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock." Cell **109**(3): 307-320.

Paoletti, P. and Neyton, J. (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 39-47.

Pasquale, E. B. (2005). "Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 462-475.

Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr. and Sonenberg, N. (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." Nature **371**(6500): 762-767.

Peng, Y. R., Hou, Z. H. and Yu, X. (2013). "The kinase activity of EphA4 mediates homeostatic scaling-down of synaptic strength via activation of Cdk5." Neuropharmacology **65**: 232-243.

Petsakou, A., Sapsis, T. P. and Blau, J. (2015). "Circadian Rhythms in Rho1 Activity Regulate Neuronal Plasticity and Network Hierarchy." Cell.

Phan, T. X., Chan, G. C., Sindreu, C. B., Eckel-Mahan, K. L. and Storm, D. R. (2011). "The diurnal oscillation of MAP (mitogen-activated protein) kinase and adenylyl cyclase activities in the hippocampus depends on the suprachiasmatic nucleus." J Neurosci **31**(29): 10640-10647.

Plihal, W. and Born, J. (1997). "Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory." J Cogn Neurosci **9**(4): 534-547.

Plihal, W. and Born, J. (1999). "Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory." Psychophysiology **36**(5): 571-582.

Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E. and McCarley, R. W. (2000). "Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study." Neuroscience **99**(3): 507-517.

Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjorkum, A. A., Greene, R. W. and McCarley, R. W. (1997). "Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness." Science **276**(5316): 1265-1268.

Prince, T. M., Wimmer, M., Choi, J., Havekes, R., Aton, S. and Abel, T. (2014). "Sleep deprivation during a specific 3-hour time window post-training impairs hippocampal synaptic plasticity and memory." Neurobiol Learn Mem **109**: 122-130.

Qiao, F. and Bowie, J. U. (2005). "The many faces of SAM." Sci STKE **2005**(286): re7.

Rachalski, A., Freyburger, M. and Mongrain, V. (2014). "Contribution of transcriptional and translational mechanisms to the recovery aspect of sleep regulation." Ann Med **46**(2): 62-72.

Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., Tuschl, T. and Kandel, E. R. (2012). "A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity." Cell **149**(3): 693-707.

Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. and Menaker, M. (1990). "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period." Science **247**(4945): 975-978.

Rasch, B. and Born, J. (2013). "About sleep's role in memory." Physiol Rev **93**(2): 681-766.

Rath, M. F., Rohde, K., Fahrenkrug, J. and Moller, M. (2013). "Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation." Brain Struct Funct **218**(2): 551-562.

Ravassard, P., Hamieh, A. M., Joseph, M. A., Fraize, N., Libourel, P. A., Lebarillier, L., Arthaud, S., Meissirel, C., Touret, M., Malleret, G. and Salin, P. A. (2015). "REM Sleep-Dependent Bidirectional Regulation of Hippocampal-Based Emotional Memory and LTP." Cereb Cortex.

Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C. and Taghert, P. H. (1999). "A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*." Cell **99**(7): 791-802.

Ribeiro, S., Goyal, V., Mello, C. V. and Pavlides, C. (1999). "Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience." Learn Mem **6**(5): 500-508.

Richter, M., Murai, K. K., Bourgin, C., Pak, D. T. and Pasquale, E. B. (2007). "The EphA4 receptor regulates neuronal morphology through SPAR-mediated inactivation of Rap GTPases." J Neurosci **27**(51): 14205-14215.

Riedner, B. A., Vyazovskiy, V. V., Huber, R., Massimini, M., Esser, S., Murphy, M. and Tononi, G. (2007). "Sleep homeostasis and cortical synchronization: III. A high-density EEG study of sleep slow waves in humans." Sleep **30**(12): 1643-1657.

Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C. and Friend, S. H. (2000). "Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles." Science **287**(5454): 873-880.

Roberts, G. W., Woodhams, P. L., Bryant, M. G., Crow, T. J., Bloom, S. R. and Polak, J. M. (1980). "VIP in the rat brain: evidence for a major pathway linking the amygdala and hypothalamus via the stria terminalis." Histochemistry **65**(2): 103-119.

Roehrs, T., Kapke, A., Roth, T. and Breslau, N. (2006). "Sex differences in the polysomnographic sleep of young adults: a community-based study." Sleep Med **7**(1): 49-53.

Romcy-Pereira, R. and Pavlides, C. (2004). "Distinct modulatory effects of sleep on the maintenance of hippocampal and medial prefrontal cortex LTP." Eur J Neurosci **20**(12): 3453-3462.

Rudenko, A., Dawlaty, M. M., Seo, J., Cheng, A. W., Meng, J., Le, T., Faull, K. F., Jaenisch, R. and Tsai, L. H. (2013). "Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction." Neuron **79**(6): 1109-1122.

Runkel, F., Rohlmann, A., Reissner, C., Brand, S. M. and Missler, M. (2013). "Promoter-like sequences regulating transcriptional activity in neurexin and neuroligin genes." J Neurochem **127**(1): 36-47.

Rutherford, L. C., Nelson, S. B. and Turrigiano, G. G. (1998). "BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses." Neuron **21**(3): 521-530.

Saha, R. N., Liu, X. and Pahan, K. (2006). "Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine." J Neuroimmune Pharmacol **1**(3): 212-222.

Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T. M., Shamah, S. M., O'Connell, S., Cowan, C. W., Hu, L., Goldberg, J. L., Debant, A., Corfas, G., Krull, C. E. and Greenberg, M. E. (2005). "Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse." Neuron **46**(2): 191-204.

Salles, A., Romano, A. and Freudenthal, R. (2014). "Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory." J Physiol Paris **108**(4-6): 256-262.

Saper, C. B. (1985). "Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections." J Comp Neurol **237**(1): 21-46.

Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J. and Scammell, T. E. (2010). "Sleep state switching." Neuron **68**(6): 1023-1042.

Saper, C. B., Scammell, T. E. and Lu, J. (2005). "Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms." Nature **437**(7063): 1257-1263.

Savage, V. M. and West, G. B. (2007). "A quantitative, theoretical framework for understanding mammalian sleep." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 1051-1056.

Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. and Serafini, T. (2000). "Neuroigin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons." Cell **101**(6): 657-669.

Seibt, J., Dumoulin, M. C., Aton, S. J., Coleman, T., Watson, A., Naidoo, N. and Frank, M. G. (2012). "Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo." Curr Biol **22**(8): 676-682.

Sejnowski, T. J. (1999). "The book of Hebb." Neuron **24**(4): 773-776.

Seong, E., Yuan, L. and Arikath, J. (2015). "Cadherins and catenins in dendrite and synapse morphogenesis." Cell Adh Migr **9**(3): 202-213.

Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A. and Greenberg, M. E. (2001). "EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin." Cell **105**(2): 233-244.

Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., Jr. and Reppert, S. M. (1997). "Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei." Neuron **19**(6): 1261-1269.

Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F. and Saper, C. B. (1998). "Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat." J Neurosci **18**(12): 4705-4721.

Shin, J., Gu, C., Kim, J. and Park, S. (2008). "Transient activation of the MAP kinase signaling pathway by the forward signaling of EphA4 in PC12 cells." BMB Rep **41**(6): 479-484.

Shipman, S. L. and Nicoll, R. A. (2012). "A subtype-specific function for the extracellular domain of neuroigin 1 in hippocampal LTP." Neuron **76**(2): 309-316.

Shishido, E. (2012). "[Autism spectrum disorder and genes for synaptic proteins]." Brain Nerve **64**(1): 65-70.

Shochat, T., Luboshitzky, R. and Lavie, P. (1997). "Nocturnal melatonin onset is phase locked to the primary sleep gate." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): R364-370.

Siegel, J. M. (2009). "Sleep viewed as a state of adaptive inactivity." Nat Rev Neurosci **10**(10): 747-753.

Silva, R. H., Chehin, A. B., Kameda, S. R., Takatsu-Coleman, A. L., Abilio, V. C., Tufik, S. and Frussa-Filho, R. (2004). "Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice." Neurobiol Learn Mem **82**(2): 90-98.

Silver, R. and Schwartz, W. J. (2005). "The suprachiasmatic nucleus is a functionally heterogeneous timekeeping organ." Methods Enzymol **393**: 451-465.

Sindi, I. A., Tannenber, R. K. and Dodd, P. R. (2014). "Role for the neurexin-neuroligin complex in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **35**(4): 746-756.

Smith, C. and Rose, G. M. (1996). "Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze." Physiol Behav **59**(1): 93-97.

Song, J. Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T. C. and Brose, N. (1999). "Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1100-1105.

Spiegel, K., Sheridan, J. F. and Van Cauter, E. (2002). "Effect of sleep deprivation on response to immunization." JAMA **288**(12): 1471-1472.

Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y. and Malenka, R. C. (2005). "Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha." J Neurosci **25**(12): 3219-3228.

Stellwagen, D. and Malenka, R. C. (2006). "Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha." Nature **440**(7087): 1054-1059.

Steriade, M., Gloor, P., Llinas, R. R., Lopes de Silva, F. H. and Mesulam, M. M. (1990). "Report of IFCN Committee on Basic Mechanisms. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **76**(6): 481-508.

Steriade, M., Nunez, A. and Amzica, F. (1993a). "Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram." J Neurosci **13**(8): 3266-3283.

Steriade, M., Nunez, A. and Amzica, F. (1993b). "A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components." J Neurosci **13**(8): 3252-3265.

Steriade, M. and Timofeev, I. (2003). "Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations." Neuron **37**(4): 563-576.

Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J. and Rosbash, M. (2004). "Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*." Nature **431**(7010): 862-868.

Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H. and Weitz, C. J. (2002). "Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart." Nature **417**(6884): 78-83.

Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S. and Jacobsen, S. E. (2011). "5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells." Genome Biol **12**(6): R54.

Sudhof, T. C. (2008). "Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease." Nature **455**(7215): 903-911.

Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K. and Nakata, Y. (2004). "Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia." J Neurosci **24**(1): 1-7.

Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A. K., Gearing, M., Levey, A. I., Vasanthakumar, A., Godley, L. A., Chang, Q., Cheng, X., He, C. and Jin, P. (2011). "5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging." Nat Neurosci **14**(12): 1607-1616.

Szyf, M., McGowan, P. and Meaney, M. J. (2008). "The social environment and the epigenome." Environ Mol Mutagen **49**(1): 46-60.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L. and McGinty, D. (1998). "Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats." Brain Res **803**(1-2): 178-188.

Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T. and Mignot, E. (2004). "Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index." PLoS Med **1**(3): e62.

Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L. and Rao, A. (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." Science **324**(5929): 930-935.

Tallafuss, A., Constable, J. R. and Washbourne, P. (2010). "Organization of central synapses by adhesion molecules." Eur J Neurosci **32**(2): 198-206.

Thakkar, M. M., Delgiacco, R. A., Strecker, R. E. and McCarley, R. W. (2003). "Adenosinergic inhibition of basal forebrain wakefulness-active neurons: a simultaneous unit recording and microdialysis study in freely behaving cats." Neuroscience **122**(4): 1107-1113.

Thompson, C. L., Wisor, J. P., Lee, C. K., Pathak, S. D., Gerashchenko, D., Smith, K. A., Fischer, S. R., Kuan, C. L., Sunkin, S. M., Ng, L. L., Lau, C., Hawrylycz, M., Jones, A. R., Kilduff, T. S. and Lein, E. S. (2010). "Molecular and anatomical signatures of sleep deprivation in the mouse brain." Front Neurosci **4**: 165.

Thompson, R. H., Canteras, N. S. and Swanson, L. W. (1996). "Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat." J Comp Neurol **376**(1): 143-173.

Timofeev, I., Contreras, D. and Steriade, M. (1996). "Synaptic responsiveness of cortical and thalamic neurones during various phases of slow sleep oscillation in cat." J Physiol **494 (Pt 1)**: 265-278.

Tinguely, G., Finelli, L. A., Landolt, H. P., Borbely, A. A. and Achermann, P. (2006). "Functional EEG topography in sleep and waking: state-dependent and state-independent features." Neuroimage **32**(1): 283-292.

Tononi, G. and Cirelli, C. (2006). "Sleep function and synaptic homeostasis." Sleep Med Rev **10**(1): 49-62.

Tononi, G. and Cirelli, C. (2012). "Time to be SHY? Some comments on sleep and synaptic homeostasis." Neural Plast **2012**: 415250.

Tononi, G. and Cirelli, C. (2014). "Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration." Neuron **81**(1): 12-34.

Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Huganir, R. L., Bredt, D. S., Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D. (1998). "PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands." Neuron **21**(6): 1453-1463.

Trachsel, L., Tobler, I., Achermann, P. and Borbely, A. A. (1991). "Sleep continuity and the REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation." Physiol Behav **49**(3): 575-580.

Tremblay, M. E., Riad, M., Bouvier, D., Murai, K. K., Pasquale, E. B., Descarries, L. and Doucet, G. (2007). "Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus." J Comp Neurol **501**(5): 691-702.

Tremblay, M. E., Riad, M., Chierzi, S., Murai, K. K., Pasquale, E. B. and Doucet, G. (2009). "Developmental course of EphA4 cellular and subcellular localization in the postnatal rat hippocampus." J Comp Neurol **512**(6): 798-813.

Trollope, A. F., Gutierrez-Mecinas, M., Mifsud, K. R., Collins, A., Saunderson, E. A. and Reul, J. M. (2012). "Stress, epigenetic control of gene expression and memory formation." Exp Neurol **233**(1): 3-11.

Tucker, M. A., Hirota, Y., Wamsley, E. J., Lau, H., Chaklader, A. and Fishbein, W. (2006). "A daytime nap containing solely non-REM sleep enhances declarative but not procedural memory." Neurobiol Learn Mem **86**(2): 241-247.

Turrigiano, G. G. (2008). "The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses." Cell **135**(3): 422-435.

Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C. and Nelson, S. B. (1998). "Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons." Nature **391**(6670): 892-896.

Turrigiano, G. G. and Nelson, S. B. (2004). "Homeostatic plasticity in the developing nervous system." Nat Rev Neurosci **5**(2): 97-107.

Van den Pol, A. N. (1980). "The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy." J Comp Neurol **191**(4): 661-702.

Vargas, L. M., Leal, N., Estrada, L. D., Gonzalez, A., Serrano, F., Araya, K., Gysling, K., Inestrosa, N. C., Pasquale, E. B. and Alvarez, A. R. (2014). "EphA4 activation of c-Abl mediates synaptic loss and LTP blockade caused by amyloid-beta oligomers." PLoS One **9**(3): e92309.

Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T. C. and Brose, N. (2006). "Neuroligins determine synapse maturation and function." Neuron **51**(6): 741-754.

Vecsey, C. G., Baillie, G. S., Jaganath, D., Havekes, R., Daniels, A., Wimmer, M., Huang, T., Brown, K. M., Li, X. Y., Descalzi, G., Kim, S. S., Chen, T., Shang, Y. Z., Zhuo, M., Houslay, M. D. and Abel, T. (2009). "Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus." Nature **461**(7267): 1122-1125.

Vecsey, C. G., Peixoto, L., Choi, J. H., Wimmer, M., Jaganath, D., Hernandez, P. J., Blackwell, J., Meda, K., Park, A. J., Hannenhalli, S. and Abel, T. (2012). "Genomic analysis of sleep deprivation reveals translational regulation in the hippocampus." Physiol Genomics **44**(20): 981-991.

Ventskovska, O., Porkka-Heiskanen, T. and Karpova, N. N. (2015). "Spontaneous sleep-wake cycle and sleep deprivation differently induce Bdnf1, Bdnf4 and Bdnf9a DNA methylation and transcripts levels in the basal forebrain and frontal cortex in rats." J Sleep Res **24**(2): 124-130.

Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W. and Takahashi, J. S. (1994). "Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior." Science **264**(5159): 719-725.

Vivaldi, E. A., Ocampo, A., Wyneken, U., Roncagliolo, M. and Zapata, A. M. (1994). "Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat." J Neurophysiol **72**(4): 1745-1755.

Von Economo, C. (1930). "Sleep as a problem of localization." J. Nerv. Ment. Dis. **71**: 249–259.

Vosko, A. M., Schroeder, A., Loh, D. H. and Colwell, C. S. (2007). "Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system." Gen Comp Endocrinol **152**(2-3): 165-175.

Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U. and Tononi, G. (2008). "Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep." Nat Neurosci **11**(2): 200-208.

Vyazovskiy, V. V., Olcese, U., Lazimy, Y. M., Faraguna, U., Esser, S. K., Williams, J. C., Cirelli, C. and Tononi, G. (2009). "Cortical firing and sleep homeostasis." Neuron **63**(6): 865-878.

Wallace, E., Kim do, Y., Kim, K. M., Chen, S., Blair Braden, B., Williams, J., Jasso, K., Garcia, A., Rho, J. M., Bimonte-Nelson, H. and Maganti, R. (2015). "Differential effects of duration of sleep fragmentation on spatial learning and synaptic plasticity in pubertal mice." Brain Res **1615**: 116-128.

Wang, G. Q., Fu, C. L., Li, J. X., Du, Y. Z. and Tong, J. (2006). "Circadian rhythms and different photoresponses of Clock gene transcription in the rat suprachiasmatic nucleus and pineal gland." Sheng Li Xue Bao **58**(4): 359-364.

Wang, H., Liu, Y., Briesemann, M. and Yan, J. (2010). "Computational analysis of gene regulation in animal sleep deprivation." Physiol Genomics **42**(3): 427-436.

Wang, L. M., Schroeder, A., Loh, D., Smith, D., Lin, K., Han, J. H., Michel, S., Hummer, D. L., Ehlen, J. C., Albers, H. E. and Colwell, C. S. (2008). "Role for the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in mediating light input to the circadian system." Eur J Neurosci **27**(7): 1771-1779.

Watts, A. G., Swanson, L. W. and Sanchez-Watts, G. (1987). "Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat." J Comp Neurol **258**(2): 204-229.

Webster, H. H. and Jones, B. E. (1988). "Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states." Brain Res **458**(2): 285-302.

Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M. and Reppert, S. M. (1995). "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms." Neuron **14**(4): 697-706.

Werth, E., Dijk, D. J., Achermann, P. and Borbely, A. A. (1996). "Dynamics of the sleep EEG after an early evening nap: experimental data and simulations." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): R501-510.

Willi, R., Winter, C., Wieske, F., Kempf, A., Yee, B. K., Schwab, M. E. and Singer, P. (2012). "Loss of EphA4 impairs short-term spatial recognition memory performance and locomotor habituation." Genes Brain Behav **11**(8): 1020-1031.

Williams, C., Mehrian Shai, R., Wu, Y., Hsu, Y. H., Sitzler, T., Spann, B., McCleary, C., Mo, Y. and Miller, C. A. (2009). "Transcriptome analysis of synaptoneurosome identifies neuroplasticity genes overexpressed in incipient Alzheimer's disease." PLoS One **4**(3): e4936.

Wisor, J. P., O'Hara, B. F., Terao, A., Selby, C. P., Kilduff, T. S., Sancar, A., Edgar, D. M. and Franken, P. (2002). "A role for cryptochromes in sleep regulation." BMC Neurosci **3**: 20.

Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y. E. and Zhang, Y. (2011). "Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells." Genes Dev **25**(7): 679-684.

Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.

Wurts, S. W. and Edgar, D. M. (2000). "Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus." J Neurosci **20**(11): 4300-4310.

Xu, N. J., Sun, S., Gibson, J. R. and Henkemeyer, M. (2011). "A dual shaping mechanism for postsynaptic ephrin-B3 as a receptor that sculpts dendrites and synapses." Nat Neurosci **14**(11): 1421-1429.

Yasenkov, R. and Deboer, T. (2010). "Circadian regulation of sleep and the sleep EEG under constant sleep pressure in the rat." Sleep **33**(5): 631-641.

Yasenkov, R. and Deboer, T. (2011). "Interrelations and circadian changes of electroencephalogram frequencies under baseline conditions and constant sleep pressure in the rat." Neuroscience **180**: 212-221.

Yasenkov, R. and Deboer, T. (2012). "Circadian modulation of sleep in rodents." Prog Brain Res **199**: 203-218.

Yokote, H., Fujita, K., Jing, X., Sawada, T., Liang, S., Yao, L., Yan, X., Zhang, Y., Schlessinger, J. and Sakaguchi, K. (2005). "Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18866-18871.

Zeidan, A. and Ziv, N. E. (2012). "Neurologin-1 loss is associated with reduced tenacity of excitatory synapses." PLoS One **7**(7): e42314.

Zepelin, H., Siegel, JM., Tobler I., (2005). Mammalian Sleep Principles and Practice of Sleep Medicine (Fourth Edition). M. Meir H. Kryger, FRCPC, Thomas Roth, PhD, and William C. Dement, MD, PhD p 91-100.

Zhang, P., Su, L., Wang, Z., Zhang, S., Guan, J., Chen, Y., Yin, Y., Gao, F., Tang, B. and Li, Z. (2012). "The involvement of 5-hydroxymethylcytosine in active DNA demethylation in mice." Biol Reprod **86**(4): 104.

Zhou, L., Martinez, S. J., Haber, M., Jones, E. V., Bouvier, D., Doucet, G., Corera, A. T., Fon, E. A., Zisch, A. H. and Murai, K. K. (2007). "EphA4 signaling regulates phospholipase Cgamma1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology." J Neurosci **27**(19): 5127-5138.

Zhuang, Z., Yang, B., Theus, M. H., Sick, J. T., Bethea, J. R., Sick, T. J. and Liebl, D. J. (2010). "EphrinBs regulate D-serine synthesis and release in astrocytes." J Neurosci **30**(47): 16015-16024.

Zimmerman, J. E., Naidoo, N., Raizen, D. M. and Pack, A. I. (2008). "Conservation of sleep: insights from non-mammalian model systems." Trends Neurosci **31**(7): 371-376.