

Université de Montréal

Impact d'un traumatisme crânio-cérébral léger sur l'architecture du sommeil et le transcriptome dans un modèle murin

Présenté Par Meriem SABIR

Dirigé par Dre. Valérie MONGRAIN

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en sciences biomédicales option sciences psychiatriques

Février 2015

© Meriem Sabir, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Impact d'un traumatisme crânio-cérébral léger sur l'architecture du sommeil et le transcriptome dans un modèle murin

Présenté Par Meriem SABIR

est évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Valérie MONGRAIN, directeur de recherche
(Faculté de médecine. Université de Montréal)

Pierre-Paul ROMPRÉ, président rapporteur
(Faculté de médecine. Université de Montréal)

Roger GODBOUT, membre du jury
(Faculté de médecine. Université de Montréal)

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé sous la direction de Dre. Valérie Mongrain. Ma plus grande gratitude va à mon encadreur, pour sa disponibilité et la confiance en mes capacités qu'elle m'a accordée. J'ai profité du savoir-faire dont j'ai pu bénéficier au cours de ces deux années. J'aimerais aussi la remercier pour l'autonomie qu'elle m'a accordée, pour ses orientations qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Dr. Pierre-Paul Rompré, vous m'avez fait un honneur en acceptant de présider ce mémoire. Aussi, je remercie vivement Dr Roger Godbout pour avoir bien voulu juger ce travail.

Merci à tous mes collègues de laboratoire, particulièrement à Érika Belanger Nelson, la coordinatrice de laboratoire et amie. Quand je suis arrivée au labo, tu étais en congé maternité, ton arrivée a fait une différence pour moi. Merci pour ton soutien, pour ton aide et surtout pour ton écoute.

Merci également à mon collègue de laboratoire à Marlène Freyburguer pour ton aide à mon arrivée au labo pour l'apprentissage des techniques et de répondre à mes questions.

Une spéciale dédicace à ma famille qui m'a supportée pendant ces deux années d'études... Spéciale dédicace à ma mère, à mon père, et à ma tante Saadia: Je vous remercie pour votre amour, votre affection votre soutien inconditionnel qui ne cesse point, et surtout merci pour les valeurs que vous m'avez transmises. Je vous aime et vous m'avez manqué énormément.

Un grand merci à mon mari, pour ses conseils et surtout merci pour ta patience, en particulier pendant la période de rédaction. Tu m'as gâté, c'est le terme..... Merci !!!

Merci aussi à ma sœur Soumia pour tout le soutien et l'aide, et surtout pour l'amour et la tendresse que t'as donné à Sidine quand moi j'étais pas la...!

Une pensée particulière à mon ange, ma petite Sidine!

Merci à tous mes amis, surtout à ceux qui étaient si compréhensifs envers ma préoccupation, sans avoir besoin d'expliquer pourquoi je ne suis pas là, qui m'ont soutenue aux moments difficile, et qui sont encore des chers amis.

Je suis chanceuse de vous avoir dans ma vie.....Merci.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé.....	5
Abstract.....	6
Liste de tableaux.....	7
Liste des figures	8
Liste des abréviations	12
Chapitre 1: Introduction.....	14
1.1 Mise en contexte :	15
1. 2. Le sommeil	16
1.2.1 Définitions	16
1.2.1.1 Électroencéphalographie	16
1.2.1.2 Architecture du sommeil	17
1.2.2 Processus de régulation du sommeil.....	19
1.2.2.1 Processus circadien.....	19
1.2.2.2 Processus homéostatique.....	20
1.2.3 Effets de la privation de sommeil (PS) sur la cognition.....	21
1.2.4 Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'homéostasie du sommeil...	23
1.3 Le traumatisme crânien	28
1.3.1 Définition	28
1.3.2 Le traumatisme crânien léger (TCL)	28
1.3.3 Dommages dus aux TCL	30
1.3.4 Trouble de sommeil chez les TCL :.....	31
1.3.5 Implication de la génétique suite aux traumatismes crâniens.....	33
1.3.6 Réponses cellulaires, facteurs moléculaires et excitotoxicité	34
Chapitre 2 : Objectifs, hypothèses et contribution spécifique	39
2.1 Objectifs.....	40
2.2 Hypothèses.....	40
2.3 Contribution spécifique de l'étudiante.....	40
2.4 Contribution spécifique des co-auteurs de l'article	40
Chapitre 3. Méthodologies et résultats - Article de recherche	43
Article publié dans <i>Brain, Behavior and immunity</i>	43
Chapitre 4 : Discussion	83
4.1 Rappel des principaux résultats	84

4.2 Effet du TCL sur le sommeil	85
4.2.1 Sommeil chez rongeurs TCL. Similarités et différences	85
4.2.2 Sommeil des patients TCL. Similarités et différences	87
4.2.3 Des plaintes de sommeil chez les patients trauma	90
4.2.4 La neurophysiologie des circuits régulateurs du sommeil.....	90
4.2.5 Changements secondaires pouvant induire des changements neurophysiologiques :	91
4.3 Effet de la privation de sommeil après TCL.....	92
4.3.1 La privation de sommeil affecte l'expression des gènes de plasticité dans le cortex.....	93
4.3.2 La privation de sommeil affecte les gènes de l'horloge	95
4.3.3 TCL pourrait affecter l'homéostasie du calcium	96
4.3.4 Changement de l'expression des chimiokines et gènes gliaux après TCL ...	97
4.4 Limites de l'étude et perspectives	98
4.4.1 Limites de l'étude	99
4.4.2 Perspectives à venir	99
4.5 Conclusion.....	101
5 Références.....	102
Annexe 1: Article de recherche	118

Résumé

Le traumatisme crânien léger (TCL) est l'un des troubles neurologiques les plus courants affectant la santé publique. Aussi, les troubles du sommeil sont fréquents chez les patients atteints de TCL. Les études chez les rongeurs montrent que certains marqueurs de plasticité synaptique diminuent après le TCL, ce qui pourrait nuire à la plasticité du cerveau. Nous suggérons que la perte de sommeil intensifie l'effet négatif de TCL, qui peut refléter les changements des marqueurs de plasticité synaptique ou des changements des voies physiologiques qui régulent le sommeil. En utilisant un modèle de traumatisme crânien sur crâne fermé (closed head injury), nous avons étudié la relation bidirectionnelle entre le TCL et le sommeil en évaluant les effets de TCL sur l'activité électrique du cerveau par électroencéphalographie (EEG), et ceux de la privation de sommeil (PS) sur l'expression génique post-TCL. Premièrement, l'activité EEG a été enregistrée pour voir si l'architecture du sommeil est altérée suite au TCL. Nous avons ensuite voulu tester si la PS suite TCL induit des changements dans l'expression des gènes : *Arc*, *Homer1a*, *Hif1a*, *Bdnf*, *Fos* et éphrines, qui ont été liés à la plasticité synaptique et à la régulation du sommeil. Nous avons également étudié l'effet de la PS post-TCL sur le génome complet dans les régions cibles (cortex et l'hippocampe). Les principaux résultats obtenus dans cette étude confirment que TCL modifie de manière significative l'activité spectrale pendant l'éveil, le sommeil Rapid Eye Movement (REM) et le sommeil non-REM dans le deuxième 24 heures post-TCL. Fait intéressant, la capacité de maintenir de longues périodes d'éveil a été altérée immédiatement après TCL (première 24h post-TCL). La dynamique de l'activité delta pendant l'éveil a été modifiée par le TCL. Parallèlement à ces modifications, des changements dans l'expression des gènes ont été observés dans le cortex et l'hippocampe. Seulement *Arc* et *EfnA3* ont montré une interaction TCL / PS et ce dans l'hippocampe, tandis que l'expression de tous les autres gènes semblait être affectée par la PS ou TCL indépendamment. Nos résultats montrent pour la première fois que le TCL induit l'expression de deux chimiokines (*Ccl3* et *Cxcl5*) à la fois dans le cortex cérébral et l'hippocampe 2,5 jours post-TCL. Également, nous avons observé que le TCL induit une diminution de l'expression de *Lgals3* et *S100A8* dans le cortex, et une augmentation d'*Olig2* dans l'hippocampe. Les résultats concernant les effets de la PS sur le génome complet du cortex et de l'hippocampe montrent des changements significatifs dans les gènes impliqués dans diverses fonctions physiologiques, telles que les rythmes circadiens, la réponse inflammatoire, ainsi que de l'activation des cellules gliales. En général, nos résultats précisent les changements dans la qualité de l'éveil ainsi que dans l'expression de divers gènes après TCL.

Mots clés: sommeil / éveil, trauma, plasticité synaptique, EEG, activation gliale

Abstract

Mild traumatic brain injury (mTBI) is one of the most common neurological disorders affecting public health. Sleep disorders are common in patients with mTBI. Studies in rodents show that some synaptic plasticity markers decreased after mTBI which could impair brain plasticity. We suggest that sleep loss intensifies the negative effect of mTBI, which may reflect changes of synaptic plasticity markers or changes of different physiological pathway that regulates the sleep process. Using a "closed head injury" model, we have studied the bidirectional relationship between mTBI and sleep by investigating the effects of mTBI on sleep structure, and that of sleep deprivation (SD) on gene expression post-mTBI. First, EEG activity was monitored to investigate if sleep architecture is altered following mTBI. We then tested if SD, following mTBI, induces changes in gene expression of plasticity markers (*Arc*, *Homer1a*, *Hif1a*, *Bdnf*, *Fos*, and *Ephrins*), which have also been linked to sleep regulation. We also investigated the effect of SD post-mTBI on genome wide gene expression in target regions. The main results obtained in this study confirm that mTBI affects wakefulness, and significantly changes spectral activity during wakefulness, rapid eye movement (REM) sleep, and non-REM sleep on the second 24 hours post-TCL. Interestingly, the capacity to sustain long bouts of wakefulness was impaired immediately after mTBI. In addition, delta activity time course was altered by mTBI during wakefulness. In parallel to these alterations, changes in gene expression were observed. Only *Arc* and *EfnA3* showed a mTBI/SD interaction in the hippocampus specifically, whereas expression of all other genes seemed to be affected by SD or mTBI independently. Our results indicate for the first time that the TCL induced the expression of two chemokines (*Ccl3* and *Cxcl5*) in the cerebral cortex and hippocampus 2.5 days post-TCL. Also, we observed that the TCL induces a decrease in the expression of *Lgals3* and *S100A8* in the cortex, and an increase of *Olig2* in the hippocampus. Results of SD effects on genome wide gene expression in the cortex and hippocampus show significant changes in genes involved in various physiological functions, such as circadian rhythms, inflammation, and also glial cell activation. In general, our results precise changes in wakefulness as well as in expression of various genes after mTBI.

Keywords: sleep/wake process, synaptic plasticity, EEG, glial activation

Liste des tableaux

Chapitre 3. Méthodologies et résultats - Article de recherche

Table S1: Sequences of primers or probes and product numbers of probe sets used for qPCR.

Table S2: 24h mean (\pm SEM) duration (in sec) of individual bouts of wakefulness, non-rapid eye movement sleep [NREMS] and rapid eye movement sleep [REMS] in mTBI and Sham mice averaged separately for the first and the second recorded days.

Table S3: Genes with differential expression between mTBI-Control and Sham-Control mice in the cerebral cortex ($p < 0.01$).

Table S4: Genes with differential expression between mTBI-Control and Sham-Control mice in the hippocampus ($p < 0.01$).

Table S5: Biological functions and predicted regulators for which a significant enrichment was observed for genes differentially expressed with mTBI and SD in the cerebral cortex (p values computed with Fisher's Exact Tests using IPA).

Table S6: Biological functions and predicted regulators for which a significant enrichment was observed for genes differentially expressed with mTBI and SD in the hippocampus (p values computed with Fisher's Exact Tests using IPA).

Table S7: Genes with differential expression in the cerebral cortex after SD in mTBI mice (FDR < 0.05).

Table S8: Genes with differential expression in the cerebral cortex after SD in Sham mice (FDR < 0.05).

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1: Architecture du sommeil et de l'activité corticale. Mesurée par l'électroencéphalogramme (EEG) pendant l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal chez un rat (**Electrophysiological correlates of sleep homeostasis in freely behaving rats. Vyazovskiy et al., 2011**).

Figure 2: L'effet de l'interleukine-1 bêta sur le sommeil chez la souris. (**Involvement of cytokines in slow wave sleep. Krueger 2011**).

Figure 3: Les effets à court et à long terme d'un TCL (**The Young Brain and Concussion: Imaging as a Biomarker for Diagnosis and Prognosis. Toledo et al., 2012**).

Figure 4: Schéma descriptif des changements métaboliques et anatomiques en réponse au TCL. **(A):** Changements neurologiques: schéma descriptif de la réponse cellulaire post-TCL. B: changements axonaux (*The Young Brain and Concussion: Imaging as a Biomarker for Diagnosis and Prognosis*. Toledo et al., 2012).

Chapitre 3. Méthodologies et résultats - Article de recherche

Figure 1. (A) Schematic view of the ECoG/EMG recording protocol. mTBI was performed between ZT8 and ZT11 and was immediately followed by an electrode implantation surgery. The morning of the following day, mice were cabled around 15 min before ZT0 and ECoG/EMG were recorded continuously for 48 h starting at light onset. Sham control mice were recorded in parallel, and recordings were performed in groups of 4 to 6 mice. Gray bars indicate undisturbed/spontaneous wakefulness and sleep behavior (same in B), and red bars indicate ECoG/EMG recorded undisturbed/spontaneous wakefulness and sleep behavior. Light gray areas indicate dark periods (same in B). (B) Schematic view of the gene expression protocol. Mice were initially divided into two different groups in which animals were either submitted to mTBI or Sham surgery between ZT8 and ZT11. For each of these conditions, half of the animals were submitted to two consecutive days of 6 h sleep deprivation (SD), taking place between ZT0 and ZT6. All animals were then sacrificed on the morning of the third day for brain area sampling. (C) Neurological Severity Scale (NSS) score from an initial cohort of animals (n = 10 mTBI and 8 Sham). Only mTBI mice showed a significant increase in NSS score 6 h after injury in comparison to before injury (t = 3.2, p < 0.01 indicated by the star).

Figure 2. (A) Forty-eight-hour time course of vigilance state duration in mTBI and Sham mice measured using ECoG/EMG recording. The upper panel shows the time course of wakefulness, the middle panel that of NREMS and the lower panel that of REMS. The time course of the three vigilance states did not significantly differ between mTBI and Sham mice on both Day 1 (interaction: wakefulness F_{23,276} = 0.7, p = 0.9; NREMS F_{23,276} = 0.7, p = 0.9; REMS F_{23,276} = 0.8, p = 0.8) and Day 2 (interaction: wakefulness F_{23,276} = 0.7, p = 0.8; NREMS F_{23,276} = 0.7, p = 0.8; REMS F_{23,276} = 1.0, p = 0.5). The total duration of vigilance states was also similar between mTBI and Sham mice (Condition effect wakefulness: F_{1,12} < 1.3, p > 0.2; NREMS: F_{1,12} < 1.9, p

> 0.2; REMS: $F_{1,12} < 0.7, p > 0.4$). Grey areas indicate dark periods (same in B). (B) Number of long bouts of wakefulness (16min) in mTBI and Sham mice averaged for 24h, 12-h light, and 12-h dark periods separately for the first and the second recorded days. A significant Condition effect (mTBI vs. Sham) was found for 24h and 12-h dark period only for the first recorded day ($t \geq 2.3, p < 0.05$ indicated by stars; Day 1 12-h light period: $t = 1.3, p = 0.2$; Day 2: $t < 0.8, p > 0.4$).

Figure 3. (A) Wakefulness (upper panels), NREMS (middle panels) and REMS (bottom panels) relative spectral power averaged for 24 h per 0.25 Hz-bin between 0.75 to 25 Hz separately for Day 1 and Day 2 in mTBI and Sham mice. Significant group differences were observed only in NREMS for Day 1 for three bins around 5 Hz ($t > 2.2, p < 0.05$). For Day 2, significant group effects ($t > 2.2, p < 0.05$) were observed for wakefulness for Hz-bins around 5 Hz and at 16.25 and 20.25 Hz, for NREMS between 3.5 and 6.75 Hz and between 14.75 and 25 Hz, and for REMS between 3.25 and 5 Hz and between 21.75 and 23 Hz. Significant differences between mTBI and Sham mice are represented by black bars above the x-axis (thin bars: $p < 0.05$; thick bars: $p < 0.01$). Inserts show magnifications of indicated spectra with significant differences. (B) Forty-eight-hour time courses of relative delta activity during wakefulness (upper panel) and NREMS (bottom panel) in mTBI and Sham mice. A Condition (mTBI vs. Sham) by Interval interaction was found for relative delta activity during wakefulness ($F_{35,420} = 1.8, p = 0.02$). Stars indicate significant differences between mTBI and Sham mice for indicated points ($p < 0.05$, simple effect analysis). No significant Condition by Interval interaction or Condition effect was found for relative delta activity during NREMS (interaction: $F_{35,420} = 1.0, p = 0.5$; condition: $F_{1,12} = 1.8, p = 0.2$). Gray areas indicate dark periods.

Figure 4. Effect of mTBI and two consecutive days of 6 h sleep deprivation (SD) on the expression of plasticity and other target genes measured by qPCR on the third morning after surgery in the cerebral cortex and hippocampus. In the cerebral cortex, no significant interaction between Condition (mTBI vs. Sham) and Treatment (SD vs. Control (Ctrl)) and no significant Condition effect was found. Significant Treatment (SD vs. Control) effect was found for Arc, Bdnf, DnajB5, Fos, Homer1a, EfnA3 and EphA4 ($F_{1,33} > 4.3, p < 0.05$, indicated by +). In the hippocampus, a significant Condition by Treatment interaction was found for Arc and EfnA3 ($F_{1,33} > 4.6, p < 0.04$, indicated by stars), and a tendency for

Condition by Treatment interaction was observed for *Fgf1* ($F_{1,33} = 2.6, p = 0.1$). No significant Condition effect was found, but a significant Treatment (SD vs. Control) effect was found for *EfnB3* ($F_{1,33} = 8.6, p < 0.01$ indicated by +), and a tendency for a significant Treatment effect was observed for *Fos* ($F_{1,33} = 3.4, p = 0.07$).

Figure 5. Venn diagrams (upper panels) and heatmap representations (lower panels) of genes differentially expressed in mTBI and Sham mice after two days of 6 h sleep deprivation (SD) in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) as measured using high-throughput sequencing (RNA-Seq). Venn diagrams show the overlap between genes differentially expressed ($FDR < 0.05$) in mTBI and Sham mice. In the cerebral cortex, 25.6% of genes differentially expressed after SD in mTBI mice overlap with those differentially expressed in Sham mice, whereas 44% of those in Sham mice overlap with those of mTBI mice. For the hippocampus, 18.2% of genes differentially expressed after SD in mTBI mice overlap with those differentially expressed in Sham mice, while only 4.2% of those in Sham mice overlap with those of mTBI mice. Heatmaps represent the expression of the same transcripts with significant differential expression after SD in mTBI and Sham mice, separately sorted according to the direction of the change with SD. For each condition (mTBI and Sham), columns refer to three pools of RNA of three control (C) and three SD mice (total nine per group). Transcripts were ordered by hierarchical clustering (complete linkage). (C and D) qPCR validations of the effect of mTBI and SD on the expression of selected transcripts on the third morning after surgery in the cerebral cortex and hippocampus. (C) In the cerebral cortex, significant Condition effects (mTBI vs. Sham, indicated by stars) were observed for *Ccl3*, *Cxcl5*, *Gfap* and *S100a8* ($F_{1,33} > 4.3, p < 0.05$). A significant Treatment effect (SD vs. Control (Ctrl), indicated by +) was observed for *Nfil3* ($F_{1,33} > 34.6, p < 0.001$). A trend for Condition by Treatment interaction was found for *Gfap* ($F_{1,33} = 2.6, p = 0.1$). (D) In the hippocampus, significant Condition effects (mTBI vs. Sham, indicated by stars) were observed for *Ccl3*, *Cxcl5*, *Olig2* and *Gfap* ($F_{1,33} > 8.2, p < 0.05$). A significant Treatment effect (SD vs. Control, indicated by +) was observed for *Nfil3* ($F_{1,33} = 15.1, p < 0.001$). No Condition by Treatment interaction was found for qPCR validation in the hippocampus.

Supplementary information

Figure S1. RNA-Seq quantification of the effect of mTBI and of two consecutive days of 6h sleep deprivation (SD) on the expression of *Bhlhe41* on the third morning after surgery in the cerebral cortex and hippocampus.

Liste des abréviations

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Arc: Activity-mediated cytoskeleton-associated
Bdnf: Brain-derived neurotrophic factor
BCAA: Branched Chain Amino Acids
Bhlhe41: Basic helix-loop-helix family, member e41
Bmal1: Brain and muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1
Ca²⁺: Ion calcium
CaMKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
CCI : Impact cortical contrôlé
Ccl3: C-C motif ligand 3
Clock: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
Creb: Cyclic adenosine monophosphate Response Element-binding protein
Cry: Cryptochrome
Cxcl5: Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
DnajB5: DnaJ (Hsp40) Homolog Subfamily B, Member 5
EEG: Électroencéphalogramme
ECoG: Électrocorticoencéphalogramme
Eph: Ephrin receptor family
Efn: Ephrin
EMG: Électromyogramme
Fgf1: Fibroblast growth factor 1
Fos: Facteur de transcription synthétisé à la suite d'un signal activateur
GABA: Gamma-aminobutyric acid
GFAP: Glial fibrillary acidic protein
GCS: Glasgow coma scale
Homer1a: Homer protein homolog 1 a
Hz: Hertz
Hif1a: Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
IL : Interleukine
IRM: Imagerie par résonance magnétique
KO: Knockout
Lgals3 : lectine galactoside contraignant soluble 3 ou galectine-3
MAPK I: Mitogen-Activated Protein Kinase
mGluR: Récepteurs métabotropiques du glutamate
N1, N2, N3: non-rapid eye movement sleep stage 1, 2, 3
Nfil3 : Nuclear factor interleukin-3-regulated protein
NGF: Nerve growth factor
NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor
NREM: Non-Rapid Eye Movement
NSS: Neurological severity scale

Olig2: Oligodendrocyte transcription factor 2
Per: Period
PKC : Protein kinase C
Processus S : Processus homéostatique de régulation du sommeil
Processus C : Processus circadien de régulation du sommeil
PS : Privation de sommeil
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
REM: Rapid Eye Movement
ROS: Reactive oxygen species
SD: Sleep deprivation
S100a8: Calcium binding protein family
TCC: Traumatisme crâniocérébral
TCL: Traumatisme crânien léger
TDM: Tomodensitométrie
TNF: Tumor Necrosis Factor
TS: Trouble de sommeil
ZT: Zeitgeber time

Chapitre 1: Introduction

1.1 Mise en contexte :

Chez toutes les espèces animales, le sommeil est l'une des activités les plus fondamentales pour le bon fonctionnement de l'organisme et du cerveau. Il joue un rôle central dans la plasticité cérébrale, l'apprentissage, la consolidation de la mémoire, ainsi que dans la récupération des fonctions physiologiques. Le sommeil NREM, en particulier, exerce un rôle récupérateur lié à son intensité, surtout pour la récupération des fonctions cognitives (Aricò et al., 2010). Cela dit, une perturbation chronique de sommeil peut être assez nocive pour bouleverser la santé et la qualité de vie de l'individu, aussi, elle peut avoir des effets néfastes et considérables sur la performance des individus dans la vie quotidienne.

Selon le concept de l'homéostasie du sommeil, le besoin de dormir augmente durant l'éveil et se dissipe durant le sommeil, de façon exponentielle. Aussi, l'éveil prolongé augmente le besoin du sommeil. Certains marqueurs mesurés à partir de l'activité électroencéphalographique (EEG) aident à caractériser la dynamique de la régulation homéostatique du sommeil. Grâce à cette approche, nous avons évalué dans le présent travail la relation bidirectionnelle entre le trauma crânien léger (TCL) et le sommeil.

Les traumas crâniens, particulièrement les TCL, sont associés à des déficits cognitifs à long terme (Hicks et al., 1993; Milman et al., 2005). Or, ils sont les moins diagnostiqués car ils ne montrent pas des lésions tissulaires avec les techniques de neuro-imageries. Autant chez l'humain que chez les rongeurs, les données indiquent que le cycle éveil-sommeil ainsi que la qualité de sommeil sont altérés suite aux TCL (Baumann et al., 2007). En effet, les patients ayant subi un trauma crânien rapportent souvent une prévalence élevée d'insomnie, des symptômes de fatigue et de somnolence (Baumann et al., 2007 ; 2010). Ceci suggère qu'il pourrait y avoir des changements au niveau de l'architecture de sommeil chez ces patients. Ces troubles du sommeil peuvent avoir des conséquences néfastes sur le fonctionnement des individus en question, et les dommages neuronaux post-TCL peuvent induire une atteinte au niveau de la plasticité synaptique, qui génère un besoin de récupération. De manière intéressante, la restauration d'un cycle éveil-sommeil normal semble être proportionnelle avec la récupération de certaines fonctions cognitives après avoir subi un tel dommage (Wiseman-Hakes et al., 2013). Cependant, aucune étude n'a permis de distinguer les

différents stades de sommeil ni d'évaluer son intensité par l'analyse spectrale dans les premiers jours post-TCL.

De tout cela s'inspire notre étude dont l'objectif est d'étudier en détail la relation sommeil-trauma crânio-cérébral. Le but de la présente étude était d'explorer la relation bidirectionnelle entre le TCL et le sommeil : comment le TCL peut affecter l'architecture de sommeil, et dans un sens inverse, comment le manque de sommeil peut affecter l'expression des gènes associés à la plasticité cérébrale et à la récupération post-TCL. Dans cette introduction, nous allons présenter les éléments de régulations de sommeil, les caractéristiques des TCC notamment les TCL, et les troubles de sommeil qui y sont associés, et enfin décrire comment ces deux aspects (sommeil et TCC) sont liés à une réponse immunitaire.

1. 2. Le sommeil

1.2.1 Définitions

Le sommeil n'est pas un processus passif, c'est un état périodique et réversible qui comporte plusieurs niveaux d'activité cérébrale. Les recherches ont prouvé que le sommeil est un comportement essentiel à la santé et occupe généralement le tiers de notre vie (Ohlmann et O'Sullivan., 2009). Il est caractérisé par la perte de conscience et la perte de l'activité sensorielle. En outre, il implique des processus physiologiques complexes allant de l'expression des gènes et mécanismes intracellulaires jusqu'aux différents circuits neuronaux (Hobson et al., 2002). Aussi, le sommeil joue un rôle primordial dans la plasticité synaptique et dans la récupération.

1.2.1.1 Électroencéphalographie

L'électroencéphalographie (EEG) est une technique très importante qui a permis de mesurer et de caractériser l'activité électrique synchronisée et désynchronisée des neurones corticaux. Des électrodes collées sur le crâne sont reliées par des fils à un amplificateur qui enregistre l'activité électrique des neurones situés au cortex. L'activité électrique se traduit par un potentiel de champ qui chevauche la surface du cerveau et qui est mesuré sur le cuir chevelu. Il est supposé que la contribution principale aux enregistrements EEG provient de nombreux neurones situés dans les couches

corticales et en particulier de grands neurones pyramidaux dirigés vers la surface corticale, avec arborisations dendritiques étendues dans les couches superficielles parallèles à la surface corticale (Coenen., 1997; Pedley et Traub., 1990). La fréquence et l'amplitude sont les deux caractéristiques de l'EEG qui permettent l'analyse spécifique de différents stades de sommeil.

Généralement, le sommeil NREM se distingue par trois stades de sommeil appelés N1 (sommeil léger), N2 (sommeil lent) et N3 (sommeil lent profond). Les phases de sommeil lent sont caractérisées par différents types d'ondes cérébrales. En effet, les ondes delta (fréquence de 1 à 5 Hz) qui sont associés à la récupération des fonctions physique apparaissent pendant le stade N3 et y représente plus de 20% de l'EEG de sommeil (Jouvet et al., 1967; Keenan et Hirshkowitz 2011). Généralement, le stade N3 est prédominant dans le premier tiers de la nuit, tandis que le sommeil paradoxal est plus présent dans le dernier tiers de la nuit. La fréquence de l'EEG durant le sommeil NREM est généralement associée à des ondes alpha lentes (8Hz), à des ondes thêta (4-7Hz) prédominantes durant le stade N1, et des ondes delta (1-4Hz) avec l'apparition du stade N3. Généralement, les rongeurs suivent la même succession des phases de sommeil observée chez l'humain, sauf qu'il y a moins de stades chez les rongeurs comparés aux humains et la durée des stades est moins courtes, par exemple chez la souris, le sommeil REM se manifeste toutes les 4 minutes de sommeil comparé a 90 minutes chez l'humain.

1.2.1.2 Architecture du sommeil

Le début de sommeil est précédé par une période de 10 à 20 minutes pendant laquelle la sensation de fatigue et le besoin de dormir s'accroissent. Le sommeil chez l'humain suit une périodicité régulière qui comprend deux états de sommeil tel que décrit brièvement ci-haut (sommeil lent ou NREM et paradoxal ou REM) suivis par l'éveil formant ainsi l'architecture du sommeil.

Le sommeil lent (NREM : Non Rapid Eye Movement). D'une manière générale, le sommeil lent est le plus réparateur autant sur le plan physique qu'au plan psychique. Il est caractérisé par une baisse globale du débit sanguin cérébral et une diminution de l'activité des structures du tronc cérébral (Maquet et al., 1997). Le sommeil NREM

commence par le stade N1, ou le sommeil est léger, suivi du stade N2 ou le sommeil est lent et le stade N3 du sommeil lent profond, cette dernière phase semble préparer le cerveau à passer au sommeil REM (**Fig. 1**).

Le sommeil REM (Rapid Eye Movement). Le sommeil REM, aussi appelé sommeil paradoxal, est la période des rêves et de la mise en mémoire des informations acquises pendant la journée. Ce stade de sommeil se présente régulièrement toutes les 60-90 minutes chez l'humain. Dans le sommeil humain, les états de sommeil (NREM/REM) se répètent dans des périodes de temps régulières et selon des cycles de 60 à 90 minutes. Au cours d'une nuit 3 à 7 cycles de sommeil peuvent se succéder. Contrairement au sommeil lent, le sommeil REM a une fréquence EEG plus élevée avec une faible amplitude semblable à l'EEG de l'éveil et une activité musculaire EMG très faible dû à l'atonie musculaire. Aussi, le sommeil REM est caractérisé par des mouvements oculaires rapides, et une respiration irrégulière.

L'éveil. Généralement, l'éveil résulte d'une augmentation de l'activité du cortex qui produit une désynchronisation corticale. Au cours de l'éveil, la vigilance est élevée, les yeux généralement ouverts, le temps de réaction à toutes stimulations est très court et les réflexes sont vifs. Pendant cette période l'activité EEG est rapide. Il représente chez les humains près des deux tiers du temps. Plusieurs zones dans le cerveau sont impliquées dans la régulation de l'éveil et du sommeil qui sont aussi contrôlés par les processus circadien et homéostatique. Nous allons présenter avec plus de détails ces processus et leur importance dans la régulation du sommeil dans la section suivante.

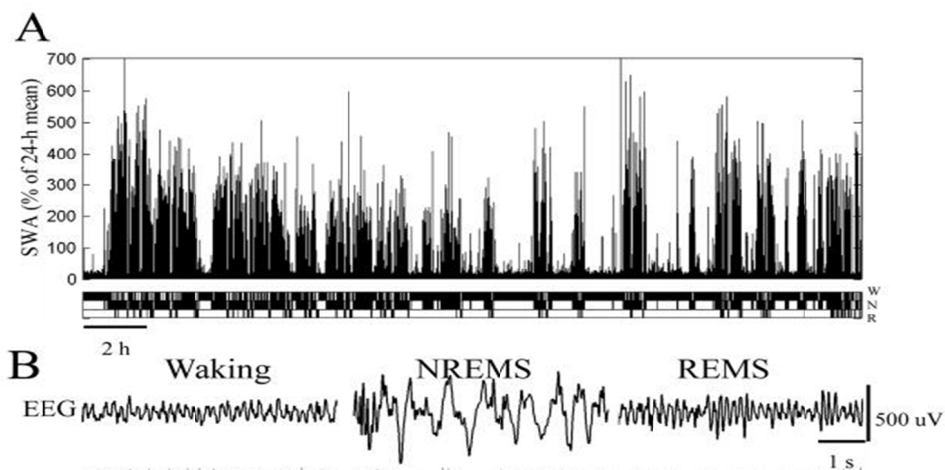


Figure 1: Architecture du sommeil et de l'activité corticale. **(A)** L'activité à ondes lentes de l'EEG et hypnogramme correspondant à 24h de baseline (référence) chez un rat. Les barres verticales

représentent valeurs consécutifs de 4-s de l'activité à ondes lentes (AOL). L'AOL diminue au cours de la période de lumière de 12 h, et augmentent après les long épisodes de l'éveil. **(B)** L'électroencéphalogramme (EEG) pendant l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal chez un rat (Reproduit de **Vyazovskiy, et al., 2011**, Electrophysiological correlates of sleep homeostasis in freely behaving rats).

1.2.2 Processus de régulation du sommeil

Il est connu que le sommeil est régulé par deux processus, impliquant que les transitions entre le sommeil et l'éveil sont médiées par l'interaction d'un processus homéostatique (processus S) et un processus circadien (Processus C) (Borbely, 1982; Daan et al., 1984). La pression contrôlé par le processus S augmente au cours de l'éveil et diminue durant le sommeil, et c'est ainsi qu'il induit la sensation du besoin de dormir et l'intensité du sommeil (Daan et al., 1984; Borbély et al., 1982 ; Franken et al., 1991). Quant au processus C, il est généré par notre horloge biologique interne située dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus. En effet, l'horloge biologique serait responsable de la rythmicité du cycle éveil-sommeil (Ralph et al., 1990; Daan et al., 1984), elle contrôle un grand nombre de fonctions physiologiques sur un rythme d'environ 24 heures, appelée rythme circadien.

1.2.2.1 Processus circadien

Le cycle éveil-sommeil est l'un des processus biologiques contrôlé par le rythme circadien (Aschoff et al., 1965; Hur et al., 1998; Lavie, 2001). Toutes les cellules du corps humain sont capables de générer ces rythmes circadiens, et la variation génétique est en partie responsable de la différence des horloges circadiennes internes et la rythmicité entre les individus (Harano et Miyatake 2010). Cette variabilité génétique peut aussi être responsable de la différence de cycle éveil-sommeil entre les individus et du chronotype qui définit les préférences pour l'horaire de sommeil (individus dits matinaux qui se couchent et se lèvent tôt ou vespéraux qui se couchent et se lèvent tard). La rétine, l'hormone mélatonine et la température corporelle jouent un rôle essentiel dans le système circadien et sont impliquées dans le contrôle des variations endogènes importantes au cours de la journée et/ou en réponse aux stimuli du cycle lumière/obscurité.

La rythmicité circadienne origine d'un ensemble de mécanismes moléculaires impliquant des gènes nommés gènes de l'horloge (ex : *Brain and muscle ARNT like 1 (Bmal1)*, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Clock)*, *Period (Per)*) (King et al., 1997). Le premier gène de l'horloge isolé est appelé *Period (per)*, pour lequel différentes mutations ont été identifiées. Ce sont des gènes qui composent une boucle de rétroaction où l'activation initiale d'un gène est régulée par ce dernier selon un cycle qui dure environ 24 h. L'horloge circadienne chez les mammifères est contrôlée par deux facteurs de transcription principaux BMAL1 et CLOCK qui forment un hétérodimère et se lient aux séquences E-box (séquence d'ADN trouvée dans certaines régions de promoteur qui agit comme un site de liaison de protéine) dans l'ADN des gènes *Period (Per1, Per2)* et *Cryptochrome (Cry1, Cry2)*. Le fonctionnement en boucle de rétroaction fait en sorte qu'après la traduction de *Per* et *Cry* en protéines, elles interagissent ensuite pour inhiber l'activité de BMAL1/CLOCK (Young et al., 2001; Ko et Takahashi 2006).

L'isolement des mutants est une approche assez prometteuse pour comprendre les fonctions de certains gènes. En effet, des souris dont le gène *Per1* est muté montrent des actogrammes ayant une période de l'horloge interne plus courte que la normale. Aussi, des souris dont le gène *Clock* est inactivé ont perdu leur rythmicité lorsqu'elles ont été plongées dans l'obscurité constante. Le gène *Clock*, isolé et séquencé. Les animaux portant la mutation *Clock* présentent un actogramme anormal.

1.2.2.2 Processus homéostatique

La dynamique de l'homéostasie du sommeil est mesurée par l'activité à ondes lentes de l'EEG (**Fig. 1**). La pression homéostatique pour le sommeil augmente pendant l'éveil et diminue pendant le sommeil. Ainsi, un manque de sommeil provoque une augmentation compensatoire de l'intensité du sommeil, tel que mesurée par l'activité à ondes lentes. Le processus S définit donc la récupération pendant le sommeil en fonction de la période d'éveil. Cette fonction récupératrice a été proposée en se basant sur le fait que l'activité à ondes lentes augmente durant le sommeil proportionnellement à la durée précédente de l'éveil.

Plusieurs hypothèses ont été développées pour répondre à la question fondamentale de la fonction du sommeil et de l'intensité du sommeil qui reste toujours un mystère. Dans les dernières décennies, de nombreuses hypothèses sur la fonction de l'homéostasie du

sommeil ont été proposées, en mettant l'accent sur le maintien de l'homéostasie cellulaire de l'énergie, la plasticité synaptique, la consolidation de la mémoire, la thermorégulation, la biosynthèse de macromolécule et sur d'autres fonctions (Abel et al., 2013; Cirelli et Tononi 2008; Diekelmann et Born 2010; Frank 2006; Mackiewicz et al 2007; Varshavsky., 2012; Vyazovskiy et Harris., 2013). Ces hypothèses ne sont pas nécessairement exclusives, il est possible et probable que différents processus moléculaires se produisent en parallèle durant le sommeil.

Dans la plupart des espèces de mammifères étudiées, la quantité de sommeil est élevée au cours de la période néonatale, la phase de la vie qui se caractérise par le développement du cerveau et beaucoup de plasticité synaptique (Frank et Heller 1997; Frank., 1997; Roffwarg et al., 1966). Ceci suggère un lien étroit entre le sommeil et la plasticité synaptique. Ainsi, l'une des principales hypothèses qui ont été abordées les dernières années est l'hypothèse de l'homéostasie synaptique proposé par Tononi et Cirelli (2003; 2006; 2013). Cette hypothèse suggère que le sommeil reflète des changements liés à la plasticité synaptique. Plus précisément, elle suggère que pendant l'éveil, les connexions entre les neurones sont augmentées en induisant ainsi le besoin de sommeil. Ceci serait lié à la régulation homéostatique du sommeil et à la récupération.

Il est établi que l'état d'éveil est associé à certains changements moléculaires, structurels et fonctionnels dans le cerveau qui se produisent progressivement. Il s'avère ainsi logique de conclure que des difficultés de sommeil en réponse à une certaine perturbation peuvent avoir un impact négatif sur la récupération, et ils peuvent également exacerber d'autres troubles. Une étude effectuée sur des patients vaccinés, ayant subi ensuite une privation de sommeil ou non, a rapporté que ceux qui ont été privés de sommeil avaient des niveaux d'anticorps plus faibles quelques semaines plus tard, ce qui démontre que le manque de sommeil peut, après la vaccination, nuire à la formation des acteurs de défenses immunitaires spécifiques de l'antigène (Spiegel et al., 2002). Ceci montre qu'outre la cognition, l'effet de manque du sommeil peut s'étendre et affecter d'autres processus physiologiques tel que le système immunitaire. Afin de mieux comprendre les conséquences de manque de sommeil, nous allons présenter les effets de la privation de sommeil dans les sections suivantes.

1.2.3 Effets de la privation de sommeil (PS) sur la cognition

La privation de sommeil expérimentale est une excellente méthode qui permet d'élucider l'importance du sommeil dans les processus physiologiques et comportementaux. De nombreuses études ont rapportés que la privation chronique de sommeil peut avoir des effets néfastes et considérables sur la performance, l'apprentissage, la mémoire et la récupération des fonctions physiques ou psychologiques (Killgore 2010; Diekelmann et Born., 2010; Palagini et Rosenlicht., 2011; Krueger et al., 1999). En général, plus la durée de l'éveil est prolongée, plus la performance est altérée. Aussi, il a été observé que le temps de réaction à des tâches de vigilance psychomotrice était plus élevé après une privation de sommeil total, partielle ou même après un sommeil fragmenté (Dinges., 1997; Belenky et al., 2003), ce qui indique que la PS entraîne un ralentissement cognitif considérable. Cette détérioration de la performance peut être restaurée quand le tiers du sommeil perdu est récupéré (Horne., 1988; 1993; Dinges et Kribbs., 1991).

Les résultats d'une étude de neuro-imagerie, ont montré qu'une seule nuit sans sommeil altère la connexion entre l'amygdale et le cortex préfrontal. Plus précisément, la PS génère une perte de contrôle et empêche l'inhibition de l'activation de l'amygdale (Yoo et al., 2007). Les auteurs de la même étude ont suggéré que le sommeil semble effectuer une remise à la base (reset) du cerveau et de la réactivité émotionnelle, en assurant le maintien de l'intégrité du circuit préfrontal. Des études chez les rongeurs montrent que la mémoire et l'apprentissage dépendent du sommeil. Des souris soumises à 6h de privation de sommeil immédiatement après une tâche de reconnaissance d'objet ont eu des troubles de mémoire, tandis que la mémoire reste intacte si la privation de sommeil n'est effectuée qu'après 6h suite à la même tâche (Palchykova et al., 2006). Ces données montrent une relation étroite entre le sommeil, la plasticité et la récupération des fonctions cognitives.

La privation de sommeil affecte la cognition, l'attention, et les comportements émotionnels contrôlés par les régions du cerveau comme le néocortex et l'hippocampe (Nilsson et al., 2005; Smith et al., 2002; Yoo et al., 2007). Dans le cortex préfrontal : Les structures corticales sont impliquées dans le maintien de l'attention et la cognition. Des données de traitement du signal électroencéphalographique (EEG) suggèrent que pendant la privation de sommeil, les performances lors des tâches de mémoire et

d'attention sont associés à une baisse de l'amplitude des caractéristiques spectrales associées à la vigilance (Gevins et al., 1997). Aussi, l'effet de l'éveil prolongé au-delà de 15 heures sur la capacité de mémoire de travail a montré une association fonctionnelle avec des déficits neuroanatomique, tel que les structures du lobe pariétal et frontal connues pour être impliquées dans la mémoire de travail et d'attention. Des données montrent que la privation de sommeil est liée à l'augmentation de l'activation du cortex préfrontal et du lobe pariétal lors de tâches de l'apprentissage. Cette information suggère que les tâches d'attention partagée nécessitent plus de ressources attentionnelles que normalement requis par une personne privée de sommeil (Drummond et al., 2001) .

Dans l'hippocampe : Des études antérieures ont montré que la perte de sommeil induit une diminution de l'activités de l'hippocampe (Yoo et al., 2007). Ceci est également suggéré par le fait que la privation de sommeil altère l'apprentissage dépendant de l'hippocampe et la mémoire, ceci est associés à des changements des molécules liés à la mémoire et à la plasticité synaptique telles que P-CaMKII, BDNF (Youngblood et al., 1997; Alhaider et al., 2010; McDermott et al., 2003). En outre, le BDNF est réduit après la PS dans l'hippocampe. Il est bien connu que le déficit d'expression hippocampique de BDNF affecte la cognition comme la reconnaissance d'objet et la mémoire spatiale (Heldt et al., 2007)

1.2.4 Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'homéostasie du sommeil

De nombreuses voies moléculaires sont associées au sommeil/éveil. Nous allons présenter dans ce chapitre la relation entre le sommeil et les marqueurs de plasticité, les cytokines et les gènes de l'horloge biologique, et comment ces éléments peuvent être impliqués dans la régulation de sommeil. Essentiellement, le sommeil est régulé via deux voies moléculaires principales :

1.2.4.1 Voies moléculaires liées à la plasticité synaptique

Suite à une privation de sommeil, l'expression des gènes de plasticité augmente immédiatement d'une manière importante au niveau de l'hippocampe et le cortex cérébral. Cela comprend les gènes de réponse immédiate (Arc, c-Fos, Ngfl-A,

Homer1a), les facteurs de transcription (Creb), les gènes liés au métabolisme, des facteurs de croissance neuronale (Bdnf) et les protéines de choc thermique (Sheng et Greenberg., 1990; Cirelli and Tononi., 2000; Chen et al., 2006; Maret et al., 2007; Aton et al., 2009; Curie et al., 2013; El Helou et al., 2013). Aussi, la privation de sommeil induit des changements sur l'expression des protéines d'adhésion synaptique telle que Nlgn1, mais ces changements varient selon la souche de l'animal et le variant transcriptionnel étudiés (El Helou et al., 2013). Le sommeil semble être régulé par ces éléments dépendant de la plasticité synaptique. Il est important de souligner que, indépendamment de la catégorie dans laquelle ils sont répertoriés, plusieurs de ces gènes qui augmentent durant l'éveil ou après la PS ont été impliqués dans les mécanismes moléculaires de la plasticité neuronale. Aussi, plusieurs de ces gènes ont été associés à l'apprentissage, la mémoire et à la cognition. La PS induit une régulation différentielle des gènes à réponse immédiate dans le noyau suprachiasmatique et le néocortex (Thompson et al., 2010). Il y a eu des évidences que les gènes d'horloge peuvent être impliqués dans l'homéostasie du sommeil dans le cortex cérébral, en particulier *Per1*, *Per2* et *Dbp*. En effet, la privation de sommeil induit l'augmentation de *Per2* principalement dans le cortex cérébral, tandis que son niveau dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) reste inchangé (Franken et al., 2007; Curie et al., 2015)

Les gènes de plasticité sont affectés différemment dans le cortex et dans l'hippocampe. Des études ont permis d'examiner l'expression des gènes de plasticité après la privation de sommeil. Cela a conduit à l'identification des classes de gènes dont les expressions sont modifiées par la privation de sommeil dans le cortex et l'hippocampe (Mackiewicz et al 2009; Wang et al., 2010).

Dans le cortex : Après des périodes de courte durée de la privation de sommeil, il y a une augmentation observée des gènes de plasticité tels que *Bdnf*, *Arc*, *c-fos* et *NGFI-A* dans le cortex cérébral. Quand la privation de sommeil s'allonge, des changements d'expression des gènes dans d'autres classes de gènes (tels que les gènes exprimant pour : des protéines de choc de chaleur, des protéines chaperons, des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion, et des composants de neurotransmission présynaptique et postsynaptique) sont observés dans le cortex (Cirelli et Tononi 2000; Tononi et Cirelli 2001; Cirelli 2002; Cirelli et al 2006; Mackiewicz et al 2009; Wang et al 2010; Curie et al 2013).

Dans l'hippocampe: Comme l'hippocampe est lié directement à l'apprentissage et la mémoire, il n'est pas surprenant que la privation de sommeil perturbe la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Les changements dans l'expression des gènes liés à la plasticité synaptique dans l'hippocampe après PS diffèrent de ce qui a été observé dans le cortex. Les chercheurs ont même observé des résultats contradictoires concernant l'expression des gènes après la privation de sommeil. Taishi et al. (2001) ont constaté que, après 8 h de la privation de sommeil, le gène à réponse immédiate *Arc* augmente dans l'hippocampe, tandis que *Bdnf* reste inchangé. Cependant, d'autres chercheurs ont observé plus tard que le *Bdnf*, ainsi que CREB, et l'expression de CAMKII ont été réduites après privation de sommeil (Guzman-Marin et al., 2006). Ces changements dans l'expression des gènes au niveau de l'hippocampe sont inversés après 2,5 h de sommeil suite à la PS (Vecsey et al. 2012).

L'état de sommeil et l'éveil diffèrent sur plusieurs volets, que ce soit en matière de comportement, du métabolisme, d'activité neuronale, des médiateurs de l'inflammation ou au niveau de l'expression des gènes. Il est évident que la transition entre ces deux états engendre d'autres changements physiologiques tels que la synthèse des protéines, les neurotransmetteurs et le métabolisme qui peuvent également être associés à la plasticité synaptique. Effectivement, des données récentes montrent que le besoin accru de sommeil induit des changements de l'expression des gènes dans le cerveau impliquant l'ensemble du génome (voir Rachalski et al., 2014 pour revue de littérature).

Les gènes de plasticité et la régulation de sommeil:

L'activité à ondes lentes (0-4 Hz) pendant le sommeil NREM est un indicateur du besoin de sommeil, car elle augmente avec la durée de l'éveil préalable et diminue pendant le sommeil. Dans une étude, Huber et ses collaborateurs (2007) ont voulu déterminer chez des rats, si la plasticité neuronale sous-tend le lien entre l'éveil et l'activité à ondes lentes. À l'aide d'une expérimentation qui combine l'EEG et la stimulation magnétique transcrânienne (SMT), ils ont mesurés la quantité d'activité à ondes lentes (AOL) durant le sommeil suivant une tâche d'apprentissage. Plus précisément, les sujets de l'étude ont subi une potentialisation par SMT et les réponses corticales ainsi que les changements locaux en AOL ont été surveillés à l'aide l'EEG. Les résultats montrent que

la SMT produit une potentialisation suivie par une augmentation locale des AOL durant le sommeil. Ensuite ils ont mesuré l'expression corticale de gènes liés à la plasticité (*Bdnf*, *Arc*, *Homer*, *NGFI-A*). Leur étude suggère un lien direct entre la plasticité synaptique déclenché durant l'éveil et identifie BDNF comme un médiateur majeur de ce lien au niveau moléculaire. En effet, après une privation de sommeil par manipulation douce chez les jeunes rats, les niveaux corticaux de *Bdnf* ont été augmentés (Hairston et al., 2004). De plus, suite à une cartographie du génome, Thompson et al. (2010) ont montrés que l'expression d'*Arc* est augmenté dans le cortex et l'hippocampe des souris ayant subi 6h de privation de sommeil comparés aux contrôles.

1.2.4.2 Voies moléculaires liées à l'inflammation

Il a été démontré que des perturbations du cycle veille sommeil peuvent affecter de manière significative la fonction immunitaire. Par exemple, la privation de sommeil augmente les taux circulants de marqueurs inflammatoires telles que l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale (TNF) α , et la protéine C réactive (Vgontzas et al., 2004; Meier-Ewert et al., 2004; Irwin et al., 2004). Aussi, la perte de sommeil induit l'altération de la réponse innée de système immunitaire. Ceci est rapporté par une étude ayant observé après une nuit de privation de sommeil une augmentation significative de cytokines et de TNF- α au niveau des monocytes périphériques comparés aux contrôles (Ackermann et al., 2012; Zielinski et al., 2014). En outre, la perte de sommeil a un impact sur l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires (Irwin et al., 2006). Dans une étude sur de jeunes adultes portant sur la durée/qualité du sommeil et la sécrétion d'IL, la privation de sommeil a augmenté les niveaux diurne d'IL-6 et provoqué de la somnolence et de la fatigue pendant la journée suivante (Vgontzas et al., 1999). Ceci suggère que la perte de sommeil est assez nocive pour troubler le système immunitaire et pour créer un véritable stress pour l'organisme en général et pour le cerveau en particulier (Ackermann et al., 2012).

Les cytokines sont des molécules sécrétées par les cellules du système immunitaire qui agissent comme médiateurs et régulateurs de processus immunitaires, l'inflammation et l'hématopoïèse. Des cytokines, telles que IL-1 ou de TNF- α , NGF, IL-10 et IL-4 semblent tous faire partie d'un réseau de régulation biochimique du sommeil, et modulent plusieurs fonctions telles que la mémoire, la cognition, la fatigue et la somnolence (Pugh

et al., 2001; McAfoose et al., 2009; Kurzrock., 2001; Vgontzas et al., 1997). Il est établi que le sommeil à un rôle important dans le renforcement du système immunitaire et que celui-ci change tout au long de la journée en même temps que le cycle veille-sommeil, d'où l'existence probable d'une communication bidirectionnelle entre le sommeil et le système immunitaire (Krueger et al., 1995; Krueger et Toth., 1994). D'ailleurs, un grand nombre de variables qui influent sur le sommeil ont été liées à des mécanismes hormonaux et humoraux, qui sont régulés par une cascade biochimique impliquant des éléments du système immunitaire.

Ainsi, dans les conditions physiologiques de sommeil normal, des cytokines comme l'IL-6 et l'IL-2, sont impliquées à la régulation de sommeil. Une étude chez l'humain, a démontré que les concentrations circulantes d'IL-2 changent dans la période nocturne, avec des niveaux élevés des IL-2 dans les premières heures de sommeil (Irwin et al., 1999). Pareillement, des données suggèrent une interaction entre le sommeil, les rythmes circadiens, et les cytokines (Keller et al., 2009; Yoshida et al., 2014). Comme par exemple, la concentrations de TNF et d'IL-6 chez des patients atteints de troubles du sommeil montrent souvent des différence entre la journée et la nuit (Vgontzas et al., 1997; 1999; Bauer et al 1994). Toutes ces observations suggèrent que le sommeil est modulé par l'inflammation.

Des études au cours des dernières années ont permis d'élucider l'influence de cytokines inflammatoires sur le système circadien. En effet, des observations indiquent que les deux cytokines IL-1 et TNF inhibent l'expression des gènes de l'horloge (*Clock*, *Bmal1*, *Per*) via la perturbation d'activation des éléments de régulation E-box (Cavadini et al., 2007; Krueger et al 2007; Krueger., 2008; Petrzilka et al., 2009). De plus, le niveau de ces cytokines dans le sang est élevé en début de soirée, et plus bas dans la matinée. Par ailleurs, dans les conditions physiologiques normales, les taux plasmatiques de TNF varient parallèlement avec l'activité EEG à ondes lentes et avec la propension à s'endormir. Aussi, l'injection des deux cytokines TNF- α ou IL-1 β induit de fortes augmentations du sommeil NREM, et l'inhibition de ces mêmes cytokines réduit le sommeil NREM (**Fig. 2**). De plus, des observations chez des souris dépourvues de récepteurs TNF ou IL-1 β rapportent qu'ils dorment moins comparés aux contrôles. Ceci porte à penser que des changements des acteurs du système immunitaire peuvent assumer un rôle important dans la régulation homéostatique du sommeil (Redwine et al., 2000; Hublin et al., 2007; Papanicolaou et al., 1998).

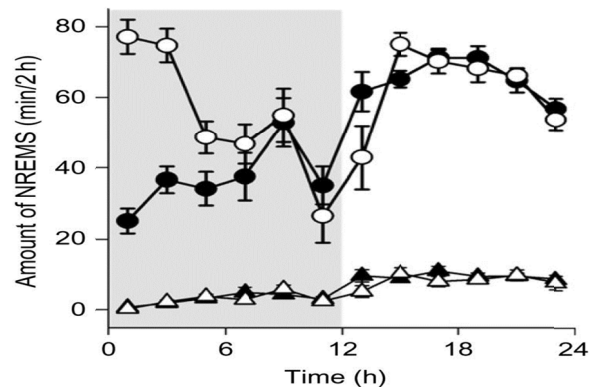


Figure 2: L'effet de l'interleukine-1 bêta sur le sommeil chez la souris. Le sommeil enregistré pour les 24h suivantes l'injection d'IL-1 β . La durée du sommeil NREM était beaucoup plus grande après IL-1 β (cercles vides) que celle observée pendant les enregistrements des contrôles (cercles pleins) pendant environ 6h. (Reproduit de **Krueger et al., 2011**; Involvement of cytokines in slow wave sleep).

Dans le même contexte, Krueger et al. (2011) proposent un rôle des cytokines TNF et IL-1 dans le fonctionnement synaptique 'Scaling', qui est l'une des principales hypothèses sur la fonction des oscillations lentes pendant le sommeil (Someren et al., 2011; Tononi et Cirelli, 2006). Ces changements aux niveaux des cytokines peuvent être en lien directe avec la plasticité synaptique, surtout que le TNF est impliqué dans l'expression des récepteurs glutamergiques et la plasticité synaptique (Pickering et al., 2005). D'autre part, la relation entre le processus inflammatoire et le sommeil est médiée en partie par l'adénosine-5'triphosphate (ATP). Comme dans toutes les cellules, l'ATP se trouve aussi dans les cellules gliales (Burnstock et al., 2007). La libération de cytokines est renforcée par l'activité neuronale via l'adénosine, qui est un produit de la dégradation de l'ATP (adénosine triphosphate). La production d'adénosine reflète aussi le niveau d'activité des neurones et des cellules gliales (Zielinski et Krueger., 2011). Également, l'adénosine a été proposé comme marqueur, pendant le sommeil et l'éveil, de la régulation homéostatique (Dworak et al., 2010).

1.3 Le traumatisme crânien

1.3.1 Définition

Le TCC est un problème de santé publique rencontré dans la communauté générale. Il entraîne un large éventail de séquelles à court et à long terme, qui peuvent persister pendant une longue période de temps. Cliniquement, les types de TCC sont classés en fonction de l'échelle de Glasgow (Glasgow coma scale (GCS)), une méthode qui permet de mesurer la sévérité d'un coma, et ce par l'évaluation de 4 critères cliniques: l'ouverture des yeux, la réponse verbale, la perte de conscience et la réponse motrice. Un TCC sévère est défini par un coma avec échelle de Glasgow < 9, et le TCC modéré se définit par un Glasgow de 9 à 12. Quant au TCL, il est traduit par un score de Glasgow de 13 à 15, avec un ou plusieurs des éléments suivants : confusion, désorientation, amnésie post-trauma inférieure à 24 heures, perte de conscience inférieure à 30 minutes (Teasdale et Jennett., 1974, Prins et al., 2013). Le présent projet portera spécifiquement sur les TCL.

1.3.2 Le traumatisme crânien léger (TCL)

Selon les données épidémiologiques, plus de 1,5 millions de personnes subissent un TCC chaque année aux États-Unis, dont 75 % sont considéré comme TCL. Ces blessures peuvent provoquer des séquelles à long terme. De plus, beaucoup de patients avec TCL ont des difficultés pour la reprise des activités quotidiennes, et peuvent devenir incapables de retourner au travail pendant plusieurs semaines voir des mois (Bazarian et al., 2005; Macciocchiet al., 1993). Outre les conséquences sur la santé humaine, le TCL entraîne des coûts élevés au budget de la santé. Aux États-Unis par exemple, le coût des TCL est de 17 milliards de dollars chaque année selon le centre national de prévention et de contrôle des traumatismes (Rapport au Congrès sur TCL aux États-Unis, 2003).

Malgré la nature légère du TCL, la prévalence des séquelles post-TCL est non négligeable. Ainsi, le TCL est fréquemment associée à un dysfonctionnement cognitif et psychologique, qui comprend des plaintes de fatigue, des maux de tête, de l'anxiété, de la dépression et bien évidemment des troubles de sommeil comme étant les plus courants (**Fig. 3**). Ces séquelles entraînent des conséquences socio-économiques importantes tel que le chômage et l'invalidité (Dikman et al., 2009; Englander et al.,

1992). En général, ces symptômes post-commotionnel affectent jusqu'à 50% des patients TCL après un mois, et entre 15 à 25% après un an (Bazarian et al., 1999; Petchprapai et Winkelman., 2007).

La variabilité du diagnostic associée à une définition plus ou moins uniforme du TCL, ainsi que le manque de biomarqueurs fiables rendent l'évaluation du pronostic de la récupération difficile (Ellenberg et al., 2009). Une meilleure identification des TCL permettrait de catégoriser l'offre des soins en fonction du niveau de gravité des blessures, du pronostic de récupération et du niveau de services nécessaires pour y répondre de manière appropriée. En outre, si le pronostic de récupération est bon pour la grande majorité des personnes atteintes de TCL, un certain nombre d'individus rapportera des symptômes persistants au-delà de trois mois (Wiseman-Hakes et al., 2011).

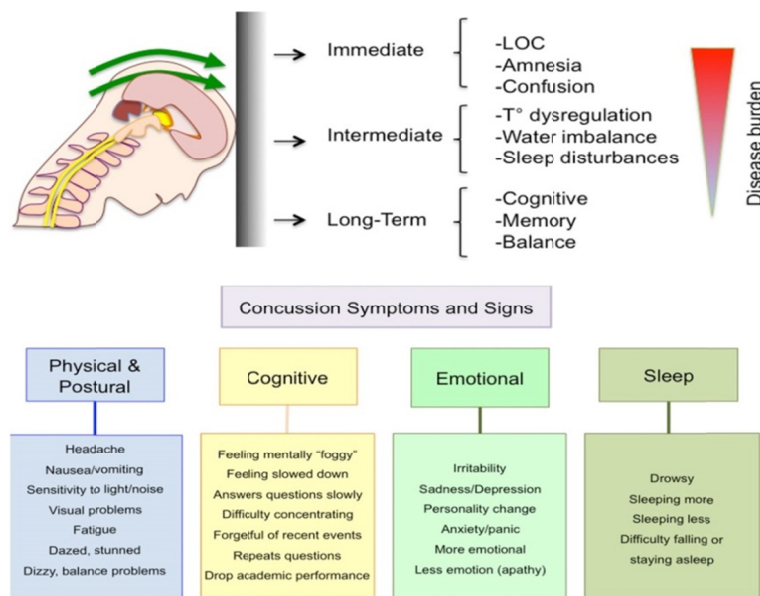


Figure 3: Les effets à court et à long terme d'un TCL. Schéma descriptif des symptômes post-commotionnels et des éléments qui servent pour le diagnostic des commotions cérébrales à court et à long terme (Reproduit de Toledo et al., 2012; *The Young Brain and Concussion: Imaging as a Biomarker for Diagnosis and Prognosis.*)

1.3.3 Dommages dus aux TCL

La plupart des études ont porté sur les TCC modérées et sévères. En conséquence, les TCL ont reçu moins d'attention comparés aux problèmes qui en découlent. Pourtant, une commotion cérébrale avec un impact moins sévère tend à affecter beaucoup plus

fréquemment les patients. C'est ainsi que les TCL sont décrits comme une épidémie silencieuse (Feinstein et Rapoport 2000). On sait que le cerveau est protégé contre les chocs par le crâne, mais les méninges et le liquide céphalo-rachidien demeurent toutefois très fragiles. Suite à la lésion, la force de l'impact externe induit une atteinte du flux sanguin et de la pression intracrânienne (**Fig. 3**). Cet impact cause souvent des dommages et des lésions aux tissus, appelés dommages primaires. Cependant, les lésions dues aux TCL sont souvent invisibles en neuro-imagerie (IRM, TDM), mais ils entraînent toutefois des altérations au niveau neuronal, telle que l'atteinte de la substance blanche, la dégénérescence des dendrites, ainsi que la réduction du nombre des synapses (Gao et al., 2011). Effectivement, une étude chez les patients TCC montre que la concentration de la matière grise a diminué dans plusieurs régions du cerveau y compris le cortex frontal et temporal comparés aux contrôles (Gale et al., 2005). Les données actuelles soulignent également que les changements de la substance blanche existent chez la population TCC à différentes sévérités, y compris les TCL. Aussi la morphologie des épines dendritiques est affectée de manière significative suite aux lésions du cortex ipsilatéral (Winston et al., 2013; Gao et al., 2011; Tay et al., 2010; Kraus et al., 2007). Ces altérations synaptiques et dendritiques peuvent nuire considérablement au fonctionnement du système nerveux central et en conséquence nuire à la mémoire, la cognition et au sommeil (Tada et Sheng., 2006).

Les changements qui succèdent aux dommages primaires donnent naissance aux dommages secondaires. Il a été montré que le TCC déclenche une réponse cellulaire (**Fig. 4A**) dans les différents circuits neuronaux que nous allons présenter dans les sections suivantes. Cette réponse cellulaire aboutie à la neuro-dégénérescence corticale et hippocampique, entraînant une perte majeure de tissu dans le cortex, qui s'étend souvent dans l'hippocampe. Aussi, des données indiquent que le TCC modéré déclenche une mort nécrotiques des neurones immatures dans l'hippocampe chez la souris (Colicos et al., 1996; Fox et al., 1998; Kochanek et al., 2006; Mtchedlishvili et al., 2010; Yang et al., 2010; Zhou et al., 2012).

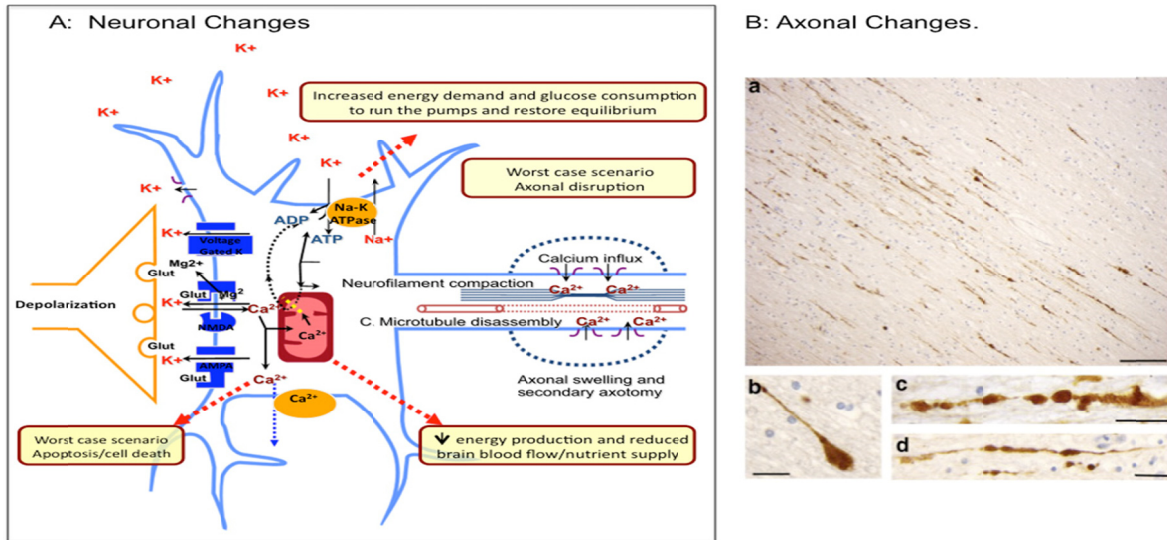


Figure 4: Schéma descriptif des changements cellulaires et métaboliques en réponse au TCL. **(A):** Certaines changements physiologiques surviennent au cerveau suite au TCL, tels que la dépolarisation neuronale, la libération de neurotransmetteurs excitateurs, des changements métaboliques et l'altération de débit sanguin cérébral. **(B):** Changements axonaux dans le tissu humain suite au TCL identifiés par APP (immunoreactivité to amyloid precursor protein) immunohistochimie. (Reproduit de Toledo et al., 2012; *The Young Brain and Concussion: Imaging as a Biomarker for Diagnosis and Prognosis*.)

1.3.4 Trouble de sommeil chez les TCL :

Les troubles de sommeil (TS) sont les problèmes les plus rapportés suite à un TCL, leur prévalence varie selon les études de 30 à 80% (Cohen et al., 1992). Les TS post-TCL peuvent prendre plusieurs formes, telles que l'hypersomnie (allongement de la durée de sommeil), l'insomnie (difficulté d'endormissement ou de maintien du sommeil), la somnolence diurne et le délai de phase (se coucher plus tard et se lever plus tard). La somnolence diurne excessive semble être la plus répandue (Baumann et al., 2012; Baumann et al., 2007). Dans les dernières années, la recherche clinique a permis la collecte des données pertinentes sur les TS à la suite de différentes formes des TCC, suggérant que les TS se développent à travers un large spectre des patients TCL (Duclos et al., 2013; 2014; Tham et al., 2012). Les données suggèrent que le sommeil altéré présente un impact négatif sur la récupération neuronale et cognitive. En outre, l'altération de sommeil peut exacerber les troubles de l'humeur, de mémoire, des troubles d'attention et de la vitesse de traitement de l'information, et il peut même être associé à la douleur post-TCL (Castriotta et al., 2009; Mahmood et al., 2004; Makley et al., 2009; Wilde et al., 2007; Bloomfield et al., 2010; Khoury et al., 2013).

Ces troubles sont suffisamment prévalents pour qu'ils soient pris en considération. Toutefois, quelques difficultés nuancent l'identification des TS post-TCL comme l'absence d'homogénéité dans la blessure puisqu'on ne retrouve pas les mêmes symptômes et les mêmes TS chez les différents patients. Plusieurs facteurs augmentent la variabilité, comme la capacité du patient à s'autoévaluer et à rapporter son vécu, à cause du choc subi qui affecte souvent la cognition (Baumann et al., 2007; Castriotta et al., 2001).

Au cours des dernières décennies, des modèles animaux ont été développés pour reproduire les différents aspects de TCC humain, afin de mieux comprendre la physiopathologie sous-jacente, et pour explorer des traitements pertinents. Pareillement pour les TCL, les modèles animaux sont nécessaires pour élucider la physiopathologie des troubles du sommeil post-TCL. Récemment, une étude utilisant un système de cage piézoélectrique pour l'enregistrement de sommeil, a montré que les souris avec un TCC modéré ou léger avaient une augmentation importante du sommeil dans les premières heures après le TCC et indépendamment du moment de la journée où la chirurgie TCC a eu lieu (Rowe et al., 2014). Cependant, les limites de cette étude n'ont pas permis l'identification des différents états de sommeil post-TCL (sommeil NREM et REM), étant donné que l'enregistrement avait été fait par un système qui n'enregistre pas l'EEG. Une autre étude menée chez des souris TCL/Sham par percussion de fluide (Fluid percussion injury (FPI)), et utilisant l'EEG, rapporte plusieurs épisodes d'éveil de courte durée une semaine après un TCL, concluant que les souris TCL étaient incapables de rester éveillées pendant de longues périodes de temps une semaine post-TCL (Lim et al., 2013). De plus les épisodes de sommeil étaient fragmentés (épisodes individuels plus courts) et la durée totale du sommeil NREM était augmentée (Lim et al., 2013). Une augmentation générale de la fragmentation des épisodes d'éveils et de sommeil a aussi été observée pendant la période d'activité des souris, et ce dans les trois premiers jours après un TCC modéré à sévère (Willie et al., 2012). Autre donnée intéressante, les neurones orexinergiques qui aident à maintenir l'éveil sont affectés suite au TCL, spécifiquement, le TCL réduit le marquage pour l'Orexine-A dans l'hypothalamus latéral (Chemelli et al., 1999; Skopin et al., 2014). Par ailleurs, ces données concordent bien avec des études menées chez l'humain, montrant une diminution des niveaux d'orexine dans le liquide céphalo-rachidien après la lésion traumatique (Nishino et al., 2001; Strawn et al., 2010). Ces données ensemble indiquent l'altération de l'éveil et des systèmes qui y sont reliés après TCL. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour élucider le développement et la physiopathologie des troubles du sommeil post-TCL et surtout pour comprendre avec plus de détail la progression du sommeil et son rôle dans la récupération suite au TCL.

Dans le même ordre d'idées, un de ces groupes a également observé des modifications dans l'activité spectrale de l'EEG pendant l'éveil, le sommeil NREM et durant le sommeil REM une semaine après-TCL (Lim et al., 2013). Plus précisément, les résultats ont montré une diminution de la fréquence du thêta pendant l'éveil et le sommeil REM chez les souris TCL comparées aux animaux contrôles (Sham), et une augmentation de la fréquence delta dans le sommeil NREM. Toutefois, la progression de l'activité EEG au cours des différents états de vigilance, incluant les indices du sommeil récupérateur tel que la dynamique de l'activité delta en sommeil NREM, reste toujours non étudiée dans les premiers jours après le TCL. En effet, le manque de littérature à ce sujet contrecarre la compréhension de l'impact précoce du TCL sur la qualité du sommeil et de l'éveil.

1.3.5 Implication de la génétique suite aux traumatismes crâniens

L'influence de facteurs génétiques dans la prédisposition à générer des symptômes post-TCC est maintenant établie. Récemment, une étude rapportait des associations entre le polymorphisme en position 308 du promoteur du gène codant le TNF- α et les résultats cliniques à 6 mois post-TCC chez des patients TCC. Ainsi, les porteurs de ce polymorphisme étaient plus susceptibles d'avoir une récupération défavorable mesurée par l'échelle de Glasgow par rapport aux non-porteurs, d'où la suggestion que la neuro-inflammation peut avoir un impact majeur suite au TCC (Waters et al., 2013).

D'autre part, le polymorphisme du codon 66 situé dans le promoteur du gène *Bdnf* a été largement étudié en lien avec les TCC. Ce polymorphisme résulte en un changement d'acide aminé d'une valine (val) à une méthionine (met) (Lipsky et al., 2005). Il semble que ce polymorphisme représente un grand intérêt pour la récupération des fonctions cognitives suite au TCL (Bagnato et al., 2012). Une étude voulant comprendre l'effet des polymorphismes du gène *Bdnf* sur le mauvais pronostic des patients ayant subi un TCL, a conclu que le polymorphisme du *Bdnf* prédit la transition à la douleur chronique suite au TCL. Plus précisément, les patients TCL avec polymorphisme val/val du gène *Bdnf* sont plus disposés à développer une chronicité des symptômes post-commotionnels comparés aux patients ayant le génotype met qui sont moins à risque et bénéficient d'une certaine neuroprotection (Khoury et al., 2013).

1.3.6 Réponses cellulaires, facteurs moléculaires et excitotoxicité

Comme mentionné ci-haut, à la suite des dommages primaires, un certain nombre d'événements neurochimiques prennent lieu dans le cerveau, y compris la modification et la libération de certains neurotransmetteurs et le processus neuro-inflammatoire (Pappius., 1991). Ce processus est déclenché par les blessures axonales, dendritiques (**Fig. 4B**) et gliales, et la libération de cytokines que nous allons voir avec plus de détails ci-bas (Pleines et al., 2001; Brough et al., 2011; Yang et al., 2013).

1.3.6.1 Réponses cellulaires

Une lésion physique donne lieu à une réponse cellulaire appelée excitotoxicité. De façon plus précise, la lésion cérébrale induit une libération excessive de certains neuromédiateurs (ex : glutamate). Une concentration élevée de glutamate occasionne de l'activité excessive des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), ce qui provoque un flux excessif de Ca^{2+} à travers ce canal ionique (Waxman and Lynch, 2005; Nilsson et al., 1993). Généralement, l'augmentation excessive des ions Ca^{2+} initie un processus complexe, où interviennent la synthèse de radicaux libres et la libération de cytokines inflammatoires. L'accumulation de ces facteurs engendre habituellement la mort cellulaire par apoptose (**Fig. 4A**) (Marshall et al., 2000; Rothman et al., 1987).

Une étude chez des rats TCC a rapporté que la signalisation du glutamate est augmentée dans les régions corticales spécifiques, et que le contrôle GABAergique est diminué suite à cet augmentation, ce qui contribue à une hyperexcitabilité corticale (Cantu et al., 2014). Aussi, les taux de glutamate extracellulaires augmente dans le cortex des rats dans la première heure après TCC (Nilsson et al., 1994; Folkersma et al., 2011) et chez l'humain 24 h post-TCC (Chamoun et al., 2010).

Nous avons présenté que les ROS interviennent dans le processus d'excitotoxicité déclenché par le TCC. Il est connu que le sommeil joue un rôle pour le nettoyage du corps de ces éléments qui peuvent être nocifs. En effet, les ROS sont généralement produites pendant l'éveil, et leurs niveaux sont fortement réduits pendant le sommeil (Reimund 1994; Ikeda et al., 2005). La clairance de ces éléments ROS qui se déroule pendant le sommeil peut donc être un moyen de défense contre le stress oxydatif (Ikeda et al., 2005). En conséquence, la perturbation du cycle éveil-sommeil va évidemment induire un stress, tout en induisant l'accumulation de ces éléments délétères. Un autre

candidat supposé être associé aux altérations suite au TCL ainsi qu'au cours du cycle éveil-sommeil, est l'adénosine. Cet élément est un régulateur de l'énergie cérébrale (Brown et al., 2012). Les lésions cérébrales génèrent une diminution d'énergie et des niveaux d'ATP qui contribue avec d'autres facteurs à la mort neuronal. L'administration de l'adénosine, qui est un élément constitutif de l'ATP, pourrait être bénéfique pour prévenir la mort des neurones suite aux TCC (Phillis et Goshgarian, 2001). Aussi, les modifications des niveaux d'adénosine suite au TCC peuvent être liées avec les troubles de sommeil conséquentes, étant donné son rôle potentiel dans l'homéostasie du sommeil (Lusardi, 2009; Dworak et al., 2010; Brown et al., 2012; Scharf et al., 2008).

1.3.6.2 Inflammation

Généralement, une réponse inflammatoire survient suite à une lésion cérébrale, cette réponse est caractérisée par l'activation des cellules gliales résidentes, la production de cytokines pro-inflammatoires et par l'infiltration de leucocytes (dont les monocytes) dans le cerveau. Plus précisément, la lésion provoque la synthèse de facteurs de transcription pro-inflammatoires (O'Neill et Kaltschmidt, 1997), du facteur induit par l'hypoxie Hif-1 (Hypoxia-inducible factor 1) (Ruscher et al., 1998) et du facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (Planas et al., 1996), ce qui initie la réponse inflammatoire. Ces facteurs favorisent l'expression des médiateurs de l'inflammation comme, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) (Lindsberg et al., 1991) et les chimiokines (la protéine chimiotactique des monocytes MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) (Wang et al., 1995; Che et al., 2001). Récemment, les auteurs d'une étude ont observé que suite au TCL, l'augmentation du sommeil est observé en parallèle de changements dans l'IL-1 β (Rowe et al., 2013, 2014). En effet, le TCC a induit une augmentation de l'IL-1 β corticale dans les premières 6 h post-TCC chez les souris TCC par rapport aux contrôles (Rowe et al., 2013, 2014). Cette cytokine pro-inflammatoire, est aussi considérée comme une substance régulant le sommeil (SRS) (**voir section 1.2.4.2**) (Krueger et al., 2007).

Les cellules gliales semblent être des acteurs importants à étudier suite à un TCC. Dans le système nerveux, elles ont pour fonctions d'assurer le maintien de l'équilibre des neurones et de produire la myéline, aussi, elles représentent environ 70 % du volume cérébral (Hertz, 2004). On distingue 4 principaux types de cellules gliales :

les oligodendrocytes , les cellules de Schwann, la microglie et les astrocytes. Les astrocytes ont plusieurs fonctions qui sont essentielles pour une fonction neuronale normale, y compris la communication neuronale et la plasticité synaptique (Todd et al., 2006). En conséquence, le fonctionnement des astrocytes peut avoir une influence déterminante sur la survie neuronale pendant l'ischémie et d'autres lésions cérébrales et également sur la croissance neuronale, et d'autres processus qui contribuent à la guérison du cerveau (Wegrzynowicz et al., 2011). Un rôle important a été attribué aux astrocytes suite au TCC qui implique la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), une protéine du cytosquelette des astrocytes. La GFAP a été proposée en tant que biomarqueur pour le diagnostic des patients TCC car son augmentation est associée à la sévérité du TCC (Diaz-Arrastia et al., 2014; Honda et al., 2010). Cette protéine est généralement libérée après la mort cellulaire. Ses caractéristiques suggèrent qu'elle peut être considérée comme un indice de mort cellulaire post-TCC. Mais ceci n'a pas été étudié chez les TCL. Parallèlement, les astrocytes contrôlent la formation et la fonction des synapses, et ont été suggérés pour offrir une nouvelle cible thérapeutique dans les troubles du sommeil (Halassa et al., 2009).

1.3.6.3 Plasticité synaptique

Le système nerveux central est une structure plastique, ayant des capacités de réparation et de réorganisation. Plus précisément, cette structure assure un maintien et une capacité de changer la structure, la connectivité et la fonction des neurones. Cependant, ce processus implique une série de mécanismes cellulaires et moléculaires comme la prolifération des dendrites, des axones, la formation des synapses et la différenciation cellulaire au cours de la migration, ainsi que des phénomènes apoptotiques (Duffau, 2001).

Des changements dans l'expression des gènes en lien avec la plasticité synaptique ont été aussi étudiés suite au TCC. En effet, des études ont confirmés une réponse importante de plusieurs gènes au TCC, tel que les gènes à réponse immédiate et des protéines chaperonnes (Rosi, 2011; He et al., 2013). Comme mentionné ci-haut, le TCL engendre un stress cellulaire qui peut impliquer beaucoup d'acteurs moléculaires (neurotropines, protéine gliale, les gènes à réponse immédiate...). Un des éléments les plus étudiés en matière de plasticité synaptique dans les TCC est la famille des

neurotrophines. Ce sont des protéines importantes pour le cerveau, en termes de croissance, prolifération, différenciation cellulaire, et plasticité synaptique. Encore plus spécifiquement, le BDNF est une des neurotrophines les plus étudiées, il joue un rôle important dans le développement neuronal, et il facilite la transmission synaptique ainsi que la promotion de l'excitabilité neuronale (Bolton et al., 2000; Kafitz et al., 1999). Des variations génétiques liées à son polymorphisme peuvent donc induire des altérations suite les TCC (comme présenté dans la section **1.3.5**). Compte tenu de la forte relation entre le BDNF et la neuro-plasticité, des études ont été menées pour déterminer si l'exercice volontaire (sur une roue de roulement) après un TCC permettrait de favoriser la récupération, sachant que l'exercice volontaire dans les conditions normales augmente le niveau de BDNF dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral. Ces études ont montré que ce type d'exercice physique n'entraîne pas des améliorations des fonctions cognitives, et il peut même aggraver les conséquences du TCC (Griesbach et al., 2004). Plus précisément, l'exercice suite au TCC en phase aiguë ne conduit pas à une augmentation de BDNF et est associée à une déficience cognitive. Suite à une lésion TCC, les circonstances de blessures induisent aussi l'augmentation d'autres marqueurs de plasticité (ex : CREB, Synapsin I, PKC (Protein kinase C), CAMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), MAPK I (Mitogen-Activated Protein Kinase) et MAPK II) (Griesbach et al., 2002; 2004; Christman et al., 1997). Cela suggère que les augmentations observées dans les protéines liées à la plasticité peuvent être le signe de l'activation d'un processus de réparation et de compensation. En outre, des études rapportent que le TCC (sévère et léger) affecte l'expression de plusieurs gènes dans les premières 24h suite au dommage. Justement, les gènes de plasticité et des facteurs de croissance diminuent dans l'hippocampe et aussi dans le cortex (Giza et al., 2002; Rall et al., 2003). Ainsi, les changements observés sur l'expression des gènes de plasticité demeurent constants entre les blessures légères et sévères. Ceci indique que le TCL pourrait être aussi nocif à la plasticité synaptique qu'un TCC sévère. De plus, l'expression des gènes semblerait être plus affectée dans l'hippocampe comparés au cortex suite au TCL (Giza et al., 2006). Malgré toutes ces observations, la littérature souffre encore du manque d'une description du phénotype de sommeil (sommeil/éveil) en parallèle aux changements moléculaires durant les premiers jours post-TCL.

Dans la présente étude, nous avons voulu tester l'effet de la privation de sommeil sur l'expression des gènes de plasticité immédiatement suite au TCL, et également l'impact sur le transcriptome complet (c.-à-d. l'expression de tous les gènes à un certain moment défini ou condition expérimentale). Nous pensons que notre étude permettra de comprendre les modifications qu'engendre un TCL sur les processus de régulation du sommeil et le fonctionnement neuronal. Particulièrement, il existe actuellement peu d'études chez les rongeurs ayant caractérisé l'effet d'un tel traumatisme sur les changements moléculaires qui sont liés au cycle éveil-sommeil, ce qui limite la compréhension de ces altérations. Nous pensons ainsi que notre étude contribuera à mieux identifier les acteurs responsables de ces altérations de l'architecture de sommeil.

Chapitre 2 : Objectifs, hypothèses et contribution spécifique

2.1 Objectifs

Pour tester nos hypothèses (voir section suivante) nous avons eu deux objectifs spécifiques:

Objectif 1: Étudier l'hypothèse selon laquelle un TCL altère immédiatement l'activité cérébrale représentative des trois états de vigilance. Pour ce faire, nous avons établi un protocole pour enregistrer l'évolution de l'ECoG suite au TCL. L'enregistrement a été lancé le lendemain de la chirurgie TCL/ Sham et ce pendant 6 jours consécutifs: 4 jours de référence (BL), suivi d'une privation de sommeil de 6h et à la fin 42h de récupération. Le présent mémoire, représente une analyse spécifique d'une étude plus étendue. Il vise donc à décrire l'évolution de l'ECoG seulement pour les deux premiers jours post-TCL.

Objectif 2: Tester l'effet de la perte de sommeil suite au TCL sur l'expression des gènes de plasticité et le génome dans le cortex et l'hippocampe. Nous avons étudié l'effet de la privation de sommeil dans les premiers jours post-TCL sur l'expression des gènes qui ont été associés avec la plasticité synaptique (*Arc*, *Bdnf*, *Homer1a*, *Fos*) et qui augmentent généralement suite à la privation de sommeil dans des études précédentes (Tononi et Cirelli, 2006; Mongrain et al., 2010; Vyazovskiy et al., 2008). Également, nous avons testé des gènes associés au stress oxydatif qui peuvent contribuer aux dommages après un TCL (*DnajB5*, *Fgf1*, *Hif1a*), ainsi que les ephrins (*EphA4*, *EphB2*, *EfnA3*, *EfnB3*) qui sont associés à la croissance neuronales et qui peuvent être altérés par le TCL (Filosa et al., 2009; Salzman et al., 2006). Suite à la chirurgie TCL/Sham, les deux groupes d'animaux ont subi deux privations de sommeil consécutives de 6h. Des sacrifices par dislocation cervicale et l'extraction des régions cérébrales d'intérêt (cortex et hippocampe) ont été effectués la troisième journée.

Compte tenu de notre premier objectif nécessitant un montage ECoG pour l'enregistrement de sommeil, nous avons mis au point un modèle de traumatisme sur crâne fermé (Closed-head injury) par chute de poids (weight-drop), qui semble efficace pour reproduire le TCL chez l'humain. Aussi, notre modèle ne nécessite pas une crâniotomie ce qui rend le crâne intacte et le cerveau moins fragile, et se qualifie aussi par la rapidité dans l'induction de l'impact lors de la chute de poids. Ce modèle a également été associé à la mort des cellules neuronales après la lésion, surtout au

niveau des couches corticales ainsi que dans l'hippocampe 24h post-TCC, et aussi à induire une réponse inflammatoire (Stahel et al., 2000; 2009; Reshef et al., 2008).

Il faut retenir que les données de littérature que nous avons présentées portent sur l'EEG, alors que dans le présent article de recherche nous citons le terme ECoG. Le terme EEG réfère à des données de surface du crâne ou intracérébral, tandis que l'ECoG représente enregistrement à la surface du cortex cérébral. Les données des deux techniques donnent des informations biologiques similaires mais dans l'article de recherche nous avons utilisé la terminologie activité électrocorticographique (ECoG) qui est plus précise.

2.2 Hypothèses

Une identification fiable des troubles du sommeil ainsi que leur origine après un TCL va potentiellement aider à cibler à long terme des voies thérapeutiques pouvant aider à la récupération et à la récupération du cerveau vie normale à la suite de TCL. Ceci est important pour prévenir tout autre trouble d'ordre psychiatrique en conséquence. A nos jours, il n'y a aucune étude qui a caractérisé l'effet immédiat du TCL sur la macro et la micro architecture du sommeil.

Dans le présent travail, nous avons supposés que :

- L'activité électrique du cerveau serait altérée dans les premiers jours suivant le traumatisme crânien léger chez la souris.
- La perte de sommeil suivant un traumatisme crânien léger chez la souris induit une diminution de l'expression des marqueurs de plasticité ainsi que des changements sur le génome au complet au niveau du cortex cérébral et l'hippocampe.

2.3 Contribution spécifique de l'étudiante

Mon travail de maîtrise portait sur l'étude de l'hypothèse que le TCL induit des altérations dans l'architecture de sommeil, et que la privation de sommeil induit des changements dans l'expression des marqueurs de plasticité. Ma tâche principale dans ce travail était de manipuler et habituer les souris qui ont été désignées pour la réalisation des expériences. Ensuite, j'ai planifié les expériences TCL, puis j'ai effectuée l'extraction de l'ARNm et la quantification de l'expression de gènes dans les régions

d'intérêt de cerveau, et l'analyse des données obtenues. Finalement, j'ai identifié visuellement les états de vigilance selon les signaux ECoG/EMG, puis j'ai analysé les résultats obtenus durant les deux premiers jours post-TCL. De plus, j'ai été la principale personne à rédiger l'article contenant nos résultats que je discuterai en détails au chapitre 4 du présent mémoire.

2.4 Contribution spécifique des co-auteurs de l'article présenté au chapitre 3

Pierre-Olivier Gaudreault: A contribué au démarrage du projet, en construisant le montage expérimental qui a permis la réalisation des chirurgies trauma de type traumatisme sur crâne fermé (closed head injury). Il a également construit le protocole ainsi que le montage expérimental pour le test comportemental NSS (voir section de la méthodologie du chapitre 3, Fig. 1C). Il a aussi réalisé les premières expériences de chirurgie trauma et l'enregistrement de sommeil des souris ayant subi les chirurgies (TCL/Sham). De plus, Pierre-Olivier Gaudreault est un co-premier auteur dans l'article de recherche présenté dans le présent mémoire, ou il a principalement participé à la rédaction de la méthodologie et de l'introduction (Fig. 1A, B de l'article de recherche).

Marlène Freyburger: A participé à la réalisation de l'expérience de séquençage de génome complet des deux régions de cerveau (cortex cérébral et hippocampe). Elle était aussi la principale personne à s'occuper de toute l'analyse des données de séquençage (Fig. 5, Tables S3, S4, S5, S6, S7, S8 de l'article de recherche), aussi elle a participé à la révision du manuscrit.

Renaud Massart: A planifié l'expérience de séquençage de génome complet du cortex et de l'hippocampe. Ensuite, il a suivi les étapes préliminaires des analyses, puis il a contribué à l'analyse de l'ensemble des résultats de séquençages obtenus (Fig. 5, Tables S3, S4, S5, S6, S7, S8 de l'article de recherche).

Alexis Blanchet-Cohen: A contribué à l'analyse de l'expérience de séquençage de génome complet de cortex cérébral et de l'hippocampe. Plus particulièrement, il a vérifié la qualité du séquençage à haut débit (voir FastQC dans section Material and Methods du chapitre 3). Aussi, il était responsable du filtrage des premiers résultats bruts de

séquençage, ce qui a permis d'obtenir des données propres et concises. Ensuite, il a aligné les séquences sur le génome (TopHat), et il a comparé l'expression des gènes avec DeSeq.

Manar Jaber: A participé à l'identification visuelle des états de vigilance des enregistrements de l'activité ECoG/EMG durant les deux premiers jours post-TCL, et aussi elle a réalisé l'analyse de ces mêmes données (Fig. 4 de l'article de recherche présenté au chapitre suivant).

Nadia Gosselin: Ce projet a été développé en collaboration avec Dre Gosselin, qui a de l'expertise en recherche sur les traumatismes crâniens chez l'humain et les troubles de sommeil qui y sont reliés. Elle a contribué majoritairement au lancement du projet, à savoir, l'application à la demande de subvention, et aussi au choix de modèle de TCL. En outre, elle a révisé le manuscrit et a donné plusieurs suggestions pour les versions révisées.

Valérie Mongrain: Est le chercheur principal dans le projet, qui a rédigé le projet et les hypothèses. Elle a participé aux chirurgies TCL/Sham, et elle a assuré l'encadrement et la gestion des expériences ainsi que la rédaction du manuscrit. De plus, elle a participé aux analyses des données de sommeil présentées dans le manuscrit (Fig. 2, 3).

Chapitre 3. Méthodologies et résultats - Article de recherche

Article sous press: *Brain, Behavior and immunity*

- Date de soumission initiale : 30-08-2014
- Date d'acceptation à la revue : 22-12-2014
- Date de publication en ligne : 08-01-2015

Impact of Traumatic Brain Injury on Sleep Structure, Electrocorticographic Activity and Transcriptome in Mice

Meriem SABIR^{a,b,+}, Pierre-Olivier GAUDREAU^{a,c,+}, Marlène FREYBURGER^{a,d},
Renaud MASSART^e, Alexis BLANCHET-COHEN^f, Manar JABER^a, Nadia GOSSELIN^{a,c},
Valérie MONGRAIN^{a,d,*}

^aCenter for Advanced Research in Sleep Medicine and Research Center, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 Gouin West Blvd., Montreal, QC, H4J1C5, Canada;
^bDepartment of Psychiatry, ^cDepartment of Psychology and ^dDepartment of Neuroscience, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, QC, H3C3J7, Canada; ^eDepartment of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, McIntyre Building, 3655 Prom. Sir-William-Osler, Montreal, QC, H3G1Y6, Canada;
^fBioinformatics, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, QC, H2W1R7, Canada.

Accepted for publication in: *Brain, Behavior, and Immunity*

Short Title: Sleep and gene expression after mTBI

Corresponding author:

*Valérie Mongrain, Ph.D.

Center for Advanced Research in Sleep Medicine
Research Center - Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal
5400 Gouin West Blvd.
Montréal, Québec, H4J 1C5
Canada

Tel: 514-338-2222 ext. 3323

Fax: 514-338-2694

⁺: these authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Traumatic brain injury [TBI], including mild TBI [mTBI], is importantly associated with vigilance and sleep complaints. Because sleep is required for learning, plasticity and recovery, we here evaluated the bidirectional relationship between mTBI and sleep with two specific objectives: 1) Test that mTBI rapidly impairs sleep-wake architecture and the dynamics of the electrophysiological marker of sleep homeostasis (i.e., non-rapid eye movement sleep delta activity); 2) evaluate the impact of sleep loss following mTBI on the expression of plasticity markers that have been linked to sleep homeostasis and on genome-wide gene expression. A closed-head injury model of mTBI was used to perform a 48h electrocorticographic [ECoG] recording in mice submitted to mTBI or Sham surgery. mTBI was found to immediately decreased the capacity to sustain long bouts of wakefulness as well as the amplitude of the time course of delta (1-4 Hz) ECoG activity during wakefulness . Significant changes in ECoG spectral activity during wakefulness, non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep were observed mainly on the second recorded day. A second experiment was performed to measure gene expression in the cerebral cortex and hippocampus after a mTBI followed either by two consecutive days of 6h sleep deprivation [SD] or of undisturbed behavior (quantitative PCR and next-generation sequencing). mTBI modified the expression of genes involved in immunity, inflammation and glial function (e.g., chemokines, glial markers) and SD changed that of genes linked to circadian rhythms, synaptic activity/neuronal plasticity, neuroprotection and cell death and survival. SD appeared to affect gene expression in the cerebral cortex more importantly after mTBI than Sham surgery, which included the astrocytic marker *Gfap* that was proposed as a marker of clinical outcome after TBI. Interestingly, SD impacted the hippocampal expression of the plasticity elements *Arc* and *EfnA3* only after mTBI. Our findings support that mTBI rapidly changes wakefulness and sleep macro-architecture and gene pathways linked to immunity and inflammation. In addition, results reveal alterations in spectral signature across all vigilance states in the first days after mTBI, and that sleep loss post-mTBI reprograms the transcriptome in a brain area-specific manner and in a way that could be deleterious to brain recovery.

Keywords: closed-head injury, sleep architecture, recovery sleep, EEG spectral analysis, transcriptome, cerebral cortex, hippocampus, plasticity genes, clock genes, chemokines

3.1 INTRODUCTION

Traumatic brain injury [TBI] is a public health concern that causes important short- and long-term physical, cognitive and neurobehavioral impairments (McAllister, 2011). Up to 70% of TBI survivors suffer from sleep disturbances, including insomnia, fatigue and somnolence (Cohen et al., 1992; Duclos et al., 2014; Orff et al., 2009), which are among the most common and persistent symptoms after both moderate/severe and mild TBI [mTBI] (Ayalon et al., 2007; Mahmood et al., 2004; Pillar et al., 2003). Sleep alterations have been found to be associated with several comorbidities and with impaired quality of life (Chaput et al., 2009; Fichtenberg et al., 2000; Hou et al., 2013; Ouellet et al., 2004; Schiehser et al., 2014). Importantly, these disturbances could interfere with brain recovery (Meerlo et al., 2009; Ouellet et al., 2004), which likely originates from the key roles of sleep in brain plasticity, learning and memory consolidation (Diekelmann and Born 2010; Ohlmann and O'Sullivan, 2009).

Animal models are required to unravel the pathophysiology of sleep disturbances after mTBI and to understand the role of sleep in brain recovery following mTBI. An initial step is to describe how these disturbances develop. Despite the abundant literature on sleep-wake disturbances weeks to months following all severity of TBI in humans, less is known about sleep characteristics in the immediate days following injury, even when it comes to studies in rodents. Recent studies using a piezoelectric cage system showed that brain-injured mice had an increased percentage of rest and an increased length of rest bouts in the first few hours or the first week after a mild or moderate TBI (Rowe et al., 2013, 2014). Another group showed a decreased ability to maintain prolonged wakefulness during the active (dark) period in the first three days after a moderate-severe TBI using EEG recording in mice, which was indexed by more bouts of wakefulness of shorter duration (Willie et al., 2012). Similar findings were reported one week post-mTBI (Lim et al., 2013). Importantly, this last study also reported alterations in the mean EEG power spectra measured during wakefulness, non-rapid eye movement sleep [NREMS] as well as rapid eye movement sleep [REMS] one week post-mTBI (Lim et al., 2013). However, to our knowledge, the progression of electroencephalographic [EEG] activity during vigilance states remains unexplored in the first days after mTBI. This includes the dynamics of EEG delta activity (1-4Hz) during NREMS, which index a

sleep homeostatic process (Borbély, 1982) thought to underlie the recovery function of sleep.

Alterations in neuronal network connectivity and the inflammatory response are among potential mechanisms responsible for sleep-wake disturbances after mTBI. Indeed, imaging and histology studies presented evidence of subtle brain injuries in mTBI such as diffuse axonal injuries (Bazarian et al., 2007; Blumbergs et al., 1995; Browne et al., 2011; Inglese et al., 2005). Also, extensive axonal and dendritic degeneration and decreased synaptic density were reported after mTBI (Gao and Chen, 2011). Given that sleep depends on the activity of neuronal networks (Krueger et al., 2008), these alterations could contribute to sleep alterations post-mTBI. In parallel, secondary injury processes are immediately activated following brain injury. Glial cells release inflammatory mediators, such as interleukin-1 [IL-1] and tumor necrosis factor alpha [TNF α] (Bachstetter et al., 2013; Helmy et al., 2011; Rowe et al., 2013). These cytokines have specifically been shown to promote sleep and to alter the sleep EEG (Krueger et al., 2011).

Changes in the expression of genes involved in neuronal plasticity and regrowth after mTBI may also directly modulate sleep structure and EEG. Neuronal growth and survival is associated with high expression of neurotrophic factors and plasticity genes (Huang and Reichardt, 2001). Research has shown that some of these elements may guide regrowth of damaged neurons in developed organisms (Deister and Schmidt, 2006). One such element is brain-derived neurotrophic factor [BDNF] that seems to profit brain recovery after TBI (McAllister et al., 2012; Rostami et al., 2011). The expression of plasticity genes such as *Bdnf*, *Homer1a* and *Fos* or of their protein product is increased in the hippocampus and cortex during the first hours after mTBI (Abrous et al., 1999; Colak et al., 2012; Crack et al., 2009; Hicks et al., 1999). On the other hand, the expression of several of these plasticity elements is decreased a few days after injury (Colak et al., 2012; Hou et al., 2012; Wu et al., 2010). Importantly, most of these plasticity markers were proposed to have a role in sleep regulation and were shown to respond to sleep deprivation [SD] (El Helou et al., 2013; Huber et al., 2007; Maret et al., 2007; Mongrain et al., 2010). . In addition to a probable role of changes in plasticity genes in sleep disturbance post-TBI, this points to an impact of sleep loss on brain recovery after TBI.

In the present study, we used a closed-head injury model of mTBI to test the hypothesis that mTBI disturbs sleep-wake architecture and the dynamics of low frequency EEG activity in the first two days following injury. In parallel, we assessed if sleep loss is detrimental to brain gene expression following mTBI by measuring the effect of two consecutive days of enforced wakefulness on several plasticity markers, with focus on those linked to sleep homeostasis, and on the transcriptome in both the cerebral cortex and the hippocampus following mTBI. The cerebral cortex, a direct target of the injury, was chosen because of its predominant role in the generation of delta activity (Amzica and Steriade, 2000). The hippocampus was targeted because of its important plasticity properties (Meerlo et al., 2009) and its vulnerability to TBI (Kernie and Parent, 2010). Closed-head injury was performed since it does not involve a craniotomy or a craniectomy, which allows for both a more stable electrocorticographic [ECoG] recording montage and for a closer parallel to injuries observed in humans. Using this model, our results support that mTBI acutely alters the capacity to sustain wakefulness and reveal that it impacts ECoG activity in all vigilance states as well as the dynamics of slow ECoG activity during wakefulness. Moreover, our findings show that sleep loss following mTBI affects the brain transcriptome in a manner that depends on the targeted areas and that likely modulates brain recovery after injury.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Animals and Protocols

Male C57BL/6J mice purchased from Jackson Laboratories were used for two different experiments (n = 51). Animals were housed in individual cages in a 12h light/12h dark cycle at a temperature between 23 and 25°C with food and water available *ad libitum*, and were acclimated to these conditions for at least 6 weeks before experiments. Mice were studied between 10 and 21 weeks of age, when their weight was around 30g to reduce mortality due to TBI (see Flierl et al., 2009; Stahel et al., 2009). Mice were either subjected to a mTBI or a control Sham surgery as detailed below, which was preceded by 5 days of animal handling (5min/day) to decrease stress due to manipulation by experimenters. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Research Center of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal in accordance with Guidelines from the Canadian Council on Animal Care.

Experiment 1 (ECoG measurement, Fig. 1A): Fourteen mice (19 ± 0.5 weeks, 29.7 ± 1.0 g) were subjected to mTBI or Sham surgery ($n = 7$ per group, matched for weight) in the late afternoon (between ZT8 and ZT11 with ZT0 referring to Zeitgeber time 0, the onset of the light period, and ZT12 to the onset of the dark period). Surgeries were performed at this time, the latest possible in the light period, to ensure the shortest interval between surgery and the start of the recording, and thus to capture the earliest effect of mTBI. During that same surgical procedure, implantation of electrodes for ECoG and electromyographic [EMG] recording was performed as detailed in section 2.3. Mice were cabled the next morning before light onset and recordings started at light onset [ZT0] for both mTBI and Sham animals thus around 13 to 16h post-mTBI. ECoG/EMG was continuously recorded for 48h (Day 1 and Day 2; Fig. 1A).

Experiment 2 (gene expression measurement, Fig. 1B): Thirty-seven mice (14 ± 0.2 weeks, 27.2 ± 0.4 g) were used and separated into two surgical conditions (mTBI vs. Sham) and two treatments (SD vs. Control). The first group (referred to as mTBI-SD, $n = 10$) underwent a mTBI followed by two consecutive days of 6h SD starting at ZT0. Mice were sacrificed between ZT0 and ZT1 in the morning of the third day after 18h of recovery following the second SD. This was performed to avoid measuring the acute effect of SD. The second group (mTBI-Control, $n = 9$) underwent the same mTBI surgery but without disrupting their sleep/wake cycle until sacrifice on the third day. The third group (Sham-SD, $n = 9$) underwent all the manipulations of the mTBI-SD group without the injury. The fourth group (Sham-Control, $n = 9$) underwent a Sham surgery and were kept under an undisturbed sleep/wake cycle until sacrifice. SD was performed by gentle handling as previously performed (Franken et al., 1991; Massart et al., 2014).

3.2.2 Traumatic Brain Injury

Closed-head injury: For Experiment 1 (ECoG measurement), mTBI or Sham surgeries were performed under deep ketamine/xylazine anaesthesia (120/10 mg/kg, i.p. injection) to allow for subsequent electrode implantation surgery (see below). For Experiment 2 (gene expression measurement) involving sampling of brain areas, mTBI or Sham surgery were performed under isoflurane anaesthesia (4% for initiation and 2% for maintenance). mTBI was induced using a weight-drop model of closed-head injury similar to previously described (Flierl et al. 2009; Stahel et al., 2009). Briefly,

anesthetized mice were shaved from the ears to the eyes and the skin was washed with 70% ethanol. A 1.5cm longitudinal skin incision was performed and the impact point was marked (3mm lateral right to midline and 3mm posterior to bregma). mTBI was performed by dropping a 329g rod from a 1-cm height. Skull fracture has been observed for 7 out of 26 mice. Sham animals were used to compare trauma effects and were submitted to the exact same surgical procedures except that the weight was slowly brought to the animal's head and lifted back up (not dropped). Immediately following the impact, oxygen (2L/min) was administered per inhalation to all mice for 5 to 10 minutes. The skin incision was then closed with sutures and the animal's behavioral state was frequently monitored.

Neurological Severity Scale (NSS, Fig. 1C): A 1-cm height for weight-drop was chosen based on the ability to induce an injury considered as mild, which was evaluated using a NSS test performed on a separate cohort of animals (n = 10 mTBI and 8 Sham; surgeries under ketamine/xylazine anaesthesia). The NSS test was a standardized 10-point scale assessing neurological function that has been used for closed-head injuries (Flierl et al., 2009; Stahel et al., 2000). It represents an abbreviated version of the original 25-points scale (Chen et al., 1996) and includes 10 parameters representative of overall motor functioning, alertness and physiological behaviours (see also El Helou et al., 2013). Fig. 1C shows that TBI performed using a weight dropped from 1 to 1.3cm moderately but significantly increased NSS score 6h post-surgery, which reverted 24h post injury. Surgical procedures did not significantly increase NSS score in Sham mice. Since injuries induced by 1.3 to 1.5-cm height resulted in a 40% mortality rate in our conditions, a 1-cm height was therefore chosen for Experiments 1 and 2 to maximize survival (3.7% mortality rate, 1/27) and ensure mild injury.

3.2.3 ECoG/EMG Electrode Implantation Surgery

ECoG/EMG electrode implantation was performed as detailed previously (El Helou et al., 2013; Massart et al., 2014), after undergoing either mTBI or Sham surgery. Briefly, mice were placed in a stereotaxic frame, and two gold-plated screws (1.1mm diameter) served as ECoG electrodes and were screwed through the skull over the right cerebral hemisphere (anterior: 1.7mm lateral to midline, 1.5mm anterior to bregma; posterior:

1.7mm lateral, 1.0mm anterior to lambda). An additional gold-plated screw placed on the right hemisphere (6mm lateral, 3mm posterior to bregma) served as a reference. Three other screws were implanted as anchors over the left hemisphere. EMG electrodes were made out of two gold wires inserted between neck muscles. ECoG/EMG electrodes were cemented to the skull and soldered to a connector. Implantation surgeries took approximately one hour to perform and adequate measures were taken to maintain anaesthesia if required (i.e., 1-2% isoflurane in case of response to toe pinch). Mice were put back in individual cages to recover from surgery and were allowed 13 to 16h of recovery before cabling to a swivel contact and recording (Fig. 1A).

3.2.4 ECoG Recording and Analyses

Continuous 48h ECoG/EMG acquisition was performed at a sampling frequency of 256Hz using Lamont amplifiers and the software Harmonie (Natus, San Carlos, CA, USA). Wakefulness, NREMS, and REMS were visually assigned to individual 4-s epochs, and artifacts were simultaneously identified. For each day, the number of minutes in vigilance states per h was calculated. The number of long bouts of wakefulness (lasting at least 16-min) was calculated per 24h, and per 12h light and dark periods. The mean duration of individual bouts of vigilance states was computed for 24h. The ECoG signal of artifact-free epochs was subjected to spectral analysis using fast Fourier transform to calculate ECoG power density per 0.25-Hz bin between 0.75 and 30Hz separately for wakefulness, NREMS and REMS, and to calculate delta activity (1-4Hz) during NREMS and wakefulness. Vigilance state spectra were averaged for 24h and presented in relative activity calculated as a percentage of the mean of all Hz-bin of all states of the first recorded 24h (Day 1; Fig. 1A). Delta activity was expressed as the percentage of the 24h mean of Day 1. For NREMS, delta activity was averaged for 12 intervals during light periods, for which an equal number of epochs contributed, and 6 intervals during dark periods (Curie et al., 2013; El Helou et al., 2013). The opposite was performed for delta activity during wakefulness.

3.2.5 Reverse Transcription and Quantitative PCR

Mice were sacrificed by cervical dislocation, brains were immediately sampled and bilateral motor, somatosensory and visual cortex and bilateral whole hippocampi were

rapidly frozen on dry ice. Bilateral sampling was performed to ensure sufficient biological material for measurements and to assess the combined impact of mTBI and SD on global brain function. RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR (qPCR) were performed similar to previously (El Helou et al., 2013; Massart et al., 2014). Briefly, RNA was extracted separately for the cerebral cortex and the hippocampus region using RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada). RNA amount was verified with a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and the quality of RNA was assessed by agarose gel electrophoresis. Then, 500ng of RNA was used for reverse transcription using random hexamers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to standard procedures. qPCR was performed using a Vii7 real-time cycler (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Individual mouse cDNA were diluted and used in 10- μ L reactions with TaqMan Fast advanced Master Mix reagent (Life Technologies) under standard cycling conditions: 95°C for 20s, followed by 40 cycles of 95°C for 1s and 60°C for 20s. Each PCR reaction was done in triplicate. The three most stable endogenous controls were selected among *Actin*, TATA-box binding protein (*Tbp*), Beta-glucuronidase (*GusB*), and Ribosomal protein S9 (*Rps9*), using Expression Suite v1.0 (Life Technologies). Relative quantification was calculated using the modified $\Delta\Delta$ Ct method from Expression Suite v1.0.

The mRNA level of selected plasticity markers (*Arc*, *Bdnf*, *Fos*, *Homer1a*), adhesion and synaptic molecules (Ephrins: *EfnA3*, *EfnB3*; Eph receptor: *EphA4*; and fibroblast growth factor 1 [*Fgf1*]), hypoxia-inducible factor 1-alpha (*Hif1a*) and the heat-shock protein *DnajB5* was quantified. In addition to plasticity genes linked to sleep homeostasis (i.e., *Arc*, *Bdnf*, *Fos*, *Homer1a*), Ephrins and Eph receptors seemed particularly relevant because of their role in synaptic plasticity and their altered expression after TBI (Hånell et al., 2012; Murai and Pasquale, 2011; Theus et al 2010). The later also applies to *Hif1a* (Higashida et al., 2011). *DnajB5* was selected because of its hypothesized role in sleep homeostasis (Mongrain et al., 2010), and because heat-shock protein pathways seem to benefit brain recovery after TBI (Eroglu et al., 2014). The list of primers, probes and TaqMan Gene expression assays used is provided in Table S1 (Supplementary material). Primers and probes were purchased from Life Technologies, Invitrogen or Operon. Other gene expression measurements were performed in an identical manner

for the validation of additional targets selected from genome-wide analysis (see section 2.6).

3.2.6 Next-generation Sequencing (RNA-Seq)

Fifty bases paired-end sequencing was conducted at the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM, Montreal, QC, Canada) with an Illumina Hi-Seq 2000 according to standard manufacturer instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). This was performed using the same RNA samples of the four testing groups described above for gene expression experiment (Fig. 1B: mTBI-SD, mTBI-Control, Sham-SD and Sham-Control). Library preparation and sequencing was independently performed on three individual pools of 3 mice per group composed of 400ng of RNA per mouse. Strand-specific libraries were prepared by IRCM according to manufacturer instructions (Illumina), and three samples were run per sequencing lane.

Base call, cleaning, genomic alignment, normalization and statistical analyses of RNA-Seq data were performed by the IRCM. Base calls were made using the Illumina CASAVA 1.8 pipeline. The quality of the reads was checked with FastQC v0.10.1 (Andrews, 2014). Low quality bases (any leading or trailing base with a quality below 3, and any window of 4 bases with an average quality below 15) were removed with Trimmomatic v0.32 (Bolger et al., 2014). The total number of sequenced paired reads for each sample was between 58 and 85 million, with average Phred quality score between 35 and 37 and % duplicate between 12.3 and 16.3. After trimming, sequences were aligned to the mouse reference genome mm9 using Tophat v2.0.10 (Kim et al., 2013). Reads aligned to annotated genes were counted with HTSeq-count v0.5.3 (Anders et al., 2014). The annotation (GTF) file used for both TopHat alignment and gene quantification was downloaded from Ensembl (release version 66). Normalization of the raw reads counts relative to sequencing depth and calculations of differential gene expression were performed with DESeq2 v1.4.5 (Love and Anders, 2014). A single factor design was used for computations of differential expression where samples belonging to different conditions were compared directly. Significance levels were adjusted using false discovery rate [FDR] (Benjamini and Hochberg, 1995). Venn diagrams of differentially expressed genes were built with Venny (Oliveros, 2007) and heatmap representations with Gene-E (Broad Institute, Cambridge, MA, USA). Biological function analyses of

differentially expressed transcripts were performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, www.ingenuity.com; Qiagen), which assess the significance of the association between ensembles of transcripts and gene networks linked to biological functions using right-tailed Fisher Exact tests.

3.2.7 Statistical Analyses

The effect of mTBI on the time course of vigilance states and of delta activity was assessed using repeated-measure two-way analyses of variance (ANOVA) with factors Condition (mTBI vs. Sham) and Hour or Interval. Significance levels were adjusted for repeated measures using Huynh-Feldt correction when appropriate. The impact of mTBI on the mean duration of bouts of vigilance states and on the number of long wakefulness bouts per 24h or 12h was investigated by t-tests. ECoG spectra of the different vigilance states of mice submitted to mTBI and Sham surgery were also compared using t-tests (analysis and graphical representation performed for Hz-bins between 0.75 and 25Hz). Changes in gene expression after mTBI and SD were investigated by two-way ANOVA with factors Condition (mTBI vs. Sham) and Treatment (SD vs. Control). Statistical analyses were performed using Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Threshold for statistical significance was set to 0.05 and results are reported as mean \pm SEM.

3.3 RESULTS

3.3.1 Decreased Long Wake Bouts after mTBI

The overall time course of vigilance states showed the expected dynamics over the light-dark cycle in both mTBI and Sham mice with sleep prevailing over wakefulness during the light period, while wakefulness was predominant over NREMS and REMS during the dark (active) period. The time course of wakefulness, NREMS and REMS did not significantly differ between mTBI and Sham mice for both Day 1 and Day 2 (Fig. 2A). For both days, also the total duration (Fig. 2A) and the 24h mean duration of individual bouts (Table S2) of wakefulness, NREMS and REMS did not significantly differ between mTBI and Sham mice. Given that previous literature specifically suggests that mTBI mostly impacts the capacity to sustain wakefulness (Lim et al., 2013) and wakefulness quality, as measured by EEG in humans (Gosselin et al., 2009), we evaluated whether mTBI

mice showed modifications in the number of long bouts of wakefulness. For Day 1, mTBI mice showed significantly less bouts of 16min of wakefulness than Sham mice both for the 24h and the 12-h dark period (Fig. 2B). This difference was no longer present on Day 2, during which the number of long wakefulness bouts in mTBI mice returned to the level observed in Sham mice.

3.3.2 Modified ECoG Spectra after mTBI

For Day 1, power spectra during wakefulness and REMS did not significantly differ between mTBI and Sham mice (Fig. 3A, top and bottom left panels). However, the activity in frequencies between 4.75 and 5.5Hz during NREMS was significantly higher in mTBI mice than in Sham mice (Fig. 3A, middle left panel). The portrait was different on Day 2, where mTBI mice expressed higher spectral activity than Sham mice in many theta (4-8Hz) and some beta (16-25Hz) frequencies during all three vigilance states (Fig. 3A, right panels). More precisely, during wakefulness, activity between 3.75 and 5.75Hz and that of two faster Hz-bins was higher in mTBI than in Sham mice. During NREMS, activity between 3.5 and 6.75Hz and in most Hz-bins between 14.75 and 25 was higher in mTBI than in Sham mice, while during REMS, the group differences concerned the activity between 3.25 and 5Hz and two Hz-bins between 21.75 and 23Hz. Overall, this indicated that on the second day after mTBI, injured mice expressed more activity than Sham mice in both slow (i.e., high delta/low theta) and fast (i.e., beta) frequencies during all vigilance states.

3.3.3 Altered Wake Delta Dynamics after mTBI

To investigate if mTBI impacts the sleep recovery process (i.e., sleep homeostasis), the 48h time course of NREMS delta activity was compared between mTBI and Sham mice. In addition, because of our specific observations of alterations in wakefulness after mTBI (i.e., decreased number of long bouts, increased slow ECoG activity), the effect of mTBI on the time course of relative delta activity during wakefulness was also investigated. During wakefulness, the 48h time course of delta activity was significantly affected by mTBI (Fig. 3B, upper panel). During Day 1, a light-dark difference in delta activity

observed in Sham mice (e.g., higher wake delta in light than in dark) was absent in mTBI mice resulting in higher activity in mTBI than in Sham mice for several intervals during the dark period. The light-dark difference seemed restored in mTBI mice on Day 2 but the daily rhythm was expressed at higher delta activity levels than in Sham mice, which associated with higher delta in mTBI than Sham mice for several intervals during both the light and dark periods. Thus, the time course of delta activity during wakefulness seemed similar on Day 1 and Day 2 in Sham mice whereas for mTBI mice, it was importantly blunted on Day 1 and at a higher level than Sham mice on Day 2. In contrast, during NREMS, the time course of delta activity was not significantly affected by mTBI (Fig. 3B, lower panels). In general, the daily dynamics of NREMS delta activity was blunted on Day 1 compared to Day 2 for both mTBI and Sham mice. Because of this observation in Sham, this may result from a residual effect of the ECoG/EMG implantation surgery, which included anaesthesia that was shown to modulate NREMS delta time course after sleep deprivation (Nelson et al., 2010).

3.3.4 Expression of Target Genes after mTBI and SD

The mRNA expression of 10 target genes associated with plasticity and with sleep regulation or brain injury was measured in the cerebral cortex and the hippocampus after two consecutive days of 6h SD to investigate the impact of sleep loss on plasticity markers after mTBI. In the cerebral cortex, mTBI itself did not significantly affect the expression of the 10 target genes (i.e., *Arc*, *Bdnf*, *Dnajb5*, *Fos*, *Homer1a*, *Hif1a*, *EfnA3*, *EfnB3*, *EphA4*, *Fgf1*; Fig. 4). However, two days of SD importantly affected the expression of many of these genes. More precisely, SD decreased the expression of *Arc*, *Bdnf*, *Dnajb5*, *Fos*, *Homer1a* and *EphA4*. This is in striking contrast with the acute effect of SD (i.e., gene expression measured immediately at the end of the 6h SD), which increases the expression of most of these genes (Maret et al., 2007; Massart et al., 2014; Mongrain et al., 2010). SD also increased the expression of *EfnA3* in the mouse cerebral cortex. These SD-dependent changes were observed for both mTBI and Sham mice as no significant interaction between mTBI and SD was observed. In contrast, in the hippocampus, significant interactions between Condition (mTBI vs. Sham) and Treatment (SD vs. Control) were found for *Arc* and *EfnA3*, with SD decreasing their mRNA level only in mTBI mice (Fig. 4). An effect of SD was only

observed for *EfnB3* in the hippocampus showing that SD decreased *EfnB3* mRNA in both mTBI and Sham mice. Again, no significant main effect of mTBI was observed.

3.3.5 Changed Transcriptome after mTBI and SD

To facilitate identification of pathways affected by mTBI and sleep loss, we investigated the genome-wide effect of mTBI and SD in the cerebral cortex and hippocampus by performing RNA-Sequencing samples from Experiment 2 (Fig. 1B). Consistent with our mild model of brain injury, when comparing animals that were not submitted to SD (mTBI-Control vs. Sham-Control), few genes were affected by mTBI. For the cerebral cortex, none reached a genome-wide level of statistical significance (i.e., FDR < 0.05). With a threshold of $p < 0.01$, 17 transcripts were affected by mTBI in the cerebral cortex and 60 transcripts in the hippocampus (Table S3 and S4, Supplementary material). Biological function analysis revealed that these transcripts were significantly enriched in genes involved in inflammatory response (e.g., *S100a8*, *Lgal3*, *Cxcl*), immunological disease (e.g., *S100a9*, *Lgals3*, *C4a/C4b*), cell-to-cell signaling and interaction (e.g., *Gfap*, *B2m*, *Cxcl6*), and immune cell trafficking (e.g., *Anxa2*, *Lgals3*, *Cd9*) in both brain areas (Table S5 and S6).

Interestingly, SD seemed to differentially affect the transcriptome in mTBI and Sham mice in a brain region-specific manner. In the cerebral cortex, 172 transcripts were significantly changed by SD (FDR < 0.05) in mTBI mice while 100 transcripts were significantly modified by SD in Sham mice (Table S5 and S6). Only 44 of these were common between mTBI and Sham mice (Fig. 5A, upper panel). Mice submitted to mTBI had more transcripts responding to SD by both an increase and a decrease in comparison to Sham mice (Fig. 5A, lower panel). Transcripts changed in both mTBI and Sham mice were significantly enriched in pathways associated with circadian rhythm signaling (i.e., *Arntl*, *Nr1d1*), role of NFAT in immune response regulation (e.g., *Csnk1g2*, *Mapk3*), and corticotropin releasing hormone signaling (i.e., *Mapk3*, *Mef2c*) (Table S5). Transcripts significantly changed by SD **only in mTBI mice** were associated with GABA receptor signaling (e.g., *Adcy8*, *Gabrd*), Ephrin A signaling (i.e., *EfnA3*, *EphA10*), serotonin receptor signaling (i.e., *Adcy8*, *Maoa*), cell death and survival (e.g., *Fkbp8*, *Hif1a*), and cellular development (e.g., *Faim2*, *Gfap*, *Dbn1*) (Table S5). In contrast, transcripts changed by SD **only in Sham mice** were significantly associated

with the antiproliferative role of somatostatin receptor 2 (e.g., *Cdkn1a*, *Gng4*), GADD45 signaling (i.e., *Ccne2*, *Cdkn1a*), PI3/AKT signaling (e.g., *Ptgs2*, *Synj2*), IL-8 signaling (e.g., *Gng4*, *Gng12*), cell death and survival (e.g., *Enc1*, *Nr4a2*), and cell-mediated immune response (e.g., *Il17ra*, *Il4r*, *Egr3*) (Table S5).

In the hippocampus, mTBI mice showed much less transcripts differentially affected by SD compared to Sham mice (11 vs. 48; Fig. 5B upper panel), with only two transcripts being common between mTBI and Sham groups (Table S9 and S10). This was again observed for both increases and decreases after SD (Fig. 5B, lower panel). Unexpectedly, the two transcripts changed by SD in both mTBI and Sham mice were *Dbp* and *Nr1d1*, two known clock genes giving rise to transcriptional regulators, which again emphasize a major responsiveness of the molecular clock system to the 2-day SD paradigm used here. Transcripts significantly changed by SD **only in mTBI mice** were associated with inflammatory response, cellular function and maintenance, behavior and cell-mediated immune response for which *Bhlhe41* represented a major contributor (Table S6). Of note is that BHLHE41 (basic helix-loop-helix family member e41), also known as DEC2, is a transcription factor involved in circadian rhythm regulation that has been shown to have modulatory effects on both sleep duration and the susceptibility to sleep loss (He et al., 2009; Pellegrino et al., 2014). We also observed *Bhlhe41* expression to be significantly increased by SD in the cerebral cortex of both mTBI and Sham mice (Table S5, Fig. S1). In contrast, transcripts changed by SD **only in Sham mice** were significantly associated with axon guidance signaling (e.g., *Sema6b*, *Tuba1a*), EIF2 signaling (e.g., *Rpl13*, *Rps25*), inflammatory response (e.g., *Tubb2a*, *Mif*), cell death and survival (e.g., *Gapdh*, *Npy*), and molecular transport (e.g., *Atp5d*, *Kcnj4*) (Table S6).

3.3.6 Enhanced Expression of Chemokine and Glial Genes after mTBI

Changes in the expression of selected transcripts were validated by qPCR. Specifically, gene expression changes were validated for two chemokines (chemokine ligand-3 [*Ccl3*; also known as macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α] and chemokine C-X-C motif ligand 5 [*Cxcl5*]) shown to respond to brain insult (Mirabelli-Badenier et al., 2011). *Ccl3* was also observed to be upregulated after mTBI (Kumar et al., 2013; Redell et al., 2013). The expression of three markers of glial activation was also measured:

oligodendrocyte lineage transcription factor 2 [*Olig2*] that is increased after brain insults (Buffo et al., 2005); glia-fibrillary acidic protein [*Gfap*], a proposed biomarker of TBI (Yokobori et al., 2013); and S100 calcium binding protein A8 [*S100a8* or macrophage-inhibiting factor related protein-8 (*Mrp8*)], a microglial marker shown to be increased after both ischemia and TBI (Engel et al., 2000; Postler et al., 1997). Finally, nuclear factor interleukin 3 regulated [*Nfil3* or *E4bp4*] was targeted because of its role in the regulation of circadian rhythms (Mitsui et al., 2001) and in neuronal survival (Junghans et al., 2004).

In the cerebral cortex, mTBI increased the mRNA expression of *Ccl3*, *Cxcl5* and *Gfap*, and decreased the expression of *S100a8* (Fig. 5C). In addition, SD decreased the mRNA level of *Nfil3*. No significant Condition (mTBI vs. Sham) by Treatment (SD vs. Control) interaction was found indicating that mTBI and SD independently changed the expression of these genes in the cerebral cortex. However, the expression of the astrocytic marker *Gfap* showed a tendency for a Condition by Treatment interaction indicating that SD tended to amplify the increase produced by mTBI. In the hippocampus, mTBI also increased the expression of the chemokines *Ccl3* and *Cxcl5* as well as the expression of the glial markers *Olig2* and *Gfap* (Fig. 5D). Again, SD only affected the expression of *Nfil3*, showing a decrease after SD compared to Control. Even if the mTBI-dependent changes in expression of *Cxcl5* and *Gfap*, in particular, seemed affected by SD, no significant Condition by Treatment interaction was observed for the hippocampus indicating that mTBI and SD mostly independently affect the expression of these selected genes.

3.4 DISCUSSION

Using a murine ecological model of mild brain injury, we showed that mTBI acutely affects both the capacity to sustain long episodes of wakefulness as well as the daily dynamics of slow ECoG activity during wakefulness. In addition, we found that the activity of the cerebral cortex in the first days after mTBI is altered for several frequencies (high delta/theta, beta) in the three vigilance states, which also supports our initial hypothesis. Moreover, using a genome-wide approach, we observed, 2.5 days after injury, modifications in the expression of mediators of inflammation and of glial cell function that showed some level of specificity for the cerebral cortex and the

hippocampus, and that could represent molecular correlates of behavioral/electrophysiological changes. Finally, we report that two consecutive days of enforced wakefulness importantly affected gene expression after mTBI, particularly of genes involved in neuronal plasticity, synaptic function and circadian rhythm regulation, revealing pathways by which insufficient sleep can modulate recovery after TBI.

Our observation of subtle differences in sleep/wake architecture after mTBI is consistent with the mild nature of the injury for which several studies have reported few changes in objective measures of wakefulness and sleep duration in days to years after injury (Gosselin et al., 2009; Khoury et al., 2013; Rao et al., 2011) despite important subjective complaints (Chaput et al., 2009; Gosselin et al., 2009; Khoury et al., 2013). We observed a specific decrease in the number of long wakefulness bouts after mTBI, indicative of a decreased capacity to maintain wakefulness, which is also consistent with previous rodent literature (Lim et al., 2013; Rowe et al., 2013, 2014; Willie et al., 2012). This difference was only found in the first recorded 24h, which is reminiscent of a study showing that sleep measured via piezoelectric cages predominates in the first hours after TBI (Rowe et al., 2013). Interestingly, it seems that differences in ECoG spectral activity after mTBI mainly emerged when the number of long wakefulness bouts was restored to the level observed in Sham mice (i.e., on Day 2). This suggests that sleep/wake modifications are submitted to biphasic modifications in the first days after mTBI, with impairments in sustaining long wakefulness episodes occurring first, and being followed by alterations in ECoG activity captured by spectral analysis. Altered power spectra in the three vigilance states were also reported to be present a week after mTBI (Lim et al., 2013). However, the former study found that TBI decreased activity in frequencies above 6Hz, which is different from our observation of elevated ECoG spectral activity two days after mTBI and from increased delta during wakefulness months following mTBI in humans (Gosselin et al., 2009). This difference could be due to a different injury type (open skull vs. closed-head). In our study, larger differences between mTBI and Sham on the first recorded day after injury may have been masked by recovery from surgery. Due to our methodological conditions of closed-head injury and standard ECoG recording montage (gold standard in sleep research and spectral analysis; Franken et al., 2001), it was not possible to perform mTBI on animals previously implanted with the electrode montage. Accordingly, recovery in Sham might have prevented the observation of larger group differences on Day 1.

Of relevance, we observed a blunted dynamics of delta activity during wakefulness after mTBI, and this was specifically present on the first recorded day. Indeed, mTBI mice showed an absence of time of day-dependent changes in delta during wakefulness whereas Sham animals expressed higher wake delta during the rest (light) compared to the active (dark) period. Delta oscillations during wakefulness are generally associated with quiet wakefulness (as opposed to active wakefulness) and lapses in attention (Leemburg et al., 2010; Vyazovskiy et al., 2011), and have even been proposed as local sleep phenomenon (Krueger et al., 2008; Vyazovskiy et al., 2011). Therefore, lower waking delta during the active period might ensure maximal vigilance quality. The fact that mTBI mice specifically showed higher relative waking delta during the active period further supports a specific impairment in wakefulness quality after mTBI and importantly refines the observation of impaired capacity to sustain long bouts of wakefulness. This observation might also suggest an acute impact on the circadian timing system, which is in line with findings of altered rest-activity rhythm in the first days after moderate to severe TBI in humans (Duclos et al., 2013). Alternatively, these changes may be linked to alterations in other neuronal circuits involved in sleep/wake regulation, such as hypothalamic orexin neurons or the thalamic reticular nucleus that were both shown to be modified by TBI (Baumann et al., 2009; Hazra et al., 2014; Willie et al., 2012). Of course, understanding how the initial post-injury progression of brain activity during sleep and wakefulness is associated with the progression of cognitive functions, such as the ability to adjust to new environments after mTBI, will require further studies.

The observation of a general increase in delta activity across all 3 vigilance states after mTBI suggests that this altered ECoG signature is not linked to sleep homeostasis. In addition, we found that the time course of delta activity during NREMS was mostly preserved after mTBI. Though consistent with the unaltered nighttime decay dynamics of NREMS delta activity observed months after concussion in athletes (Gosselin et al., 2009), this result should be interpreted with caution since group differences could have been hidden by interindividual variability, which is relatively important after mTBI in a closed-head configuration as well as in clinical populations. Thus, replication of these findings with more animals should be planned. In addition, measurement of the NREMS delta response to SD will be required to definitely rule out an alteration in the recovery sleep process after mTBI. This absence of changes in NREMS delta dynamics observed in combination with an altered delta dynamics during wakefulness suggests that

neuronal activity during wakefulness is specifically influenced by the robust changes in markers of inflammation and glial cell function after mTBI, which we revealed by both biological pathway analysis of RNA-Seq data and qPCR validations. Indeed, we reported for the first time that mTBI enhanced the expression of two chemokines (*Ccl3* and *Cxcl5*) in both the cerebral cortex and hippocampus 2.5 days after injury, which supplement observations of their upregulation after brain ischemia or TBI (Kumar et al., 2013; Mirabelli-Badenier et al., 2011; Redell et al., 2013). Consistent with an induction of immune/inflammation pathways after mTBI, chemokines can be produced by microglia (Ramesh et al., 2013), the main immune cells of the central nervous system.

We also observed changes in the expression of two recognized markers of microglia activation after mTBI but specifically in the cerebral cortex: *Lgals3* (lectin galactoside-binding soluble 3 or Galactin-3) and *S100a8*. Like *Ccl3* and *Cxcl5*, *Lgals3*, which has a role in inflammation and neurodegenerative diseases (Lerman et al., 2012), was increased by mTBI in the cortex (Table S5), whereas *S100a8* was decreased after mTBI. This last observation, although opposite to findings of induction in *S100a8* after ischemia and TBI (Engel et al., 2000; Postler et al., 1997), could suggest upregulation of neuroprotective pathways after brain injury since the absence of *S100a8* has been linked to neuroprotection (Ziegler et al., 2009). Microglial activation was observed after moderate TBI both in the cerebral cortex and hippocampus (Kumar et al., 2013), and our observations support that the extent and/or the properties of this activation in the two brain areas depends on injury severity. Although cytokines were shown to modulate sleep and EEG activity (Krueger et al., 2008, 2011), further studies will need to investigate how the specific markers mentioned above could contribute to changes in wakefulness and sleep structure as well as EEG.

Following mTBI, changes in the expression of markers of the brain's two other glial cell types also reveal other potential sleep-modulatory mechanisms and brain area-specific effects. Astrocytes, in particular, were shown to release gliotransmitters directly affecting sleep/wake duration and EEG activity in slow frequencies during sleep (Halassa et al., 2009). We observed an important increased in the astrocytic marker *Gfap* after mTBI in both the cerebral cortex and the hippocampus, which is in line with the increased cortical level of GFAP protein observed one week after brain injury in mice (Hazra et al., 2014). This thus supports a contribution of astrocyte activation after mTBI to sleep/wake modifications in our conditions, and possibly to cognitive deficits via their modified state

in the hippocampus. Interestingly, to our knowledge, we are first to report *Olig2* to be specifically increased after mTBI in the hippocampus. OLIG2 is predominantly found in oligodendrocytes and has been shown to be expressed in response to different types of brain insults (Buffo et al., 2005). Given that oligodendrocytes are importantly involved in axon myelination, this observation may suggest enhanced need for re-myelination after injury in the hippocampus. Of note is that the oligodendrocyte transcriptome was recently shown to importantly vary with the duration of wakefulness and sleep in the rodent brain (Bellesi et al., 2013), suggesting a potential involvement of sleep and wakefulness alternations in central nervous system myelination. Overall, our findings indicate that even a mild brain injury seems to activate the three types of glial cells in the central nervous system and this in a brain-region specific manner.

Importantly, the increase in the expression of *Gfap* after mTBI, whose protein product has been proposed as a biomarker of TBI in humans (Yokobori et al., 2013), was particularly elevated after SD in the cerebral cortex. This suggests that SD could potentiate astrocyte activation after mTBI. Even though astrocytes can contribute to neuroprotection, their activation can also mediate abundant astrogliosis with a negative impact on brain function, and blood GFAP levels were shown to predict death after severe TBI in humans (Vos et al., 2004). Our findings may thus suggest that SD could impair brain recovery after mTBI by inducing exaggerated astrocyte reactivity. In line with this, we found that mTBI mice expressed more changes in the cerebral cortex transcriptome after SD than Sham mice. Furthermore, an important effect of two days of SD on the cortical expression of genes involved in plasticity, neuroprotection and circadian rhythms was observed, which strongly suggests a modulatory impact of SD on brain function after injury. Indeed, genes generally positively associated with learning and synaptic function (e.g., *Arc*, *Bdnf*, *Fos*, *Homer1a*) were importantly downregulated after sleep loss. Downregulated expression of *Homer1a*, in particular, may impair neuroprotective pathways because the expression of *Homer1a* was suggested to have a neuroprotective role during SD (Maret et al., 2007) and a protective role in TBI via downregulating group 1 metabotropic glutamate receptors (Luo et al 2014). In addition, because BDNF is generally associated with neuronal survival (Acheson et al., 1995), its decreased expression after SD in the cerebral cortex may impair neuronal recovery after mTBI. Finally, a major impact of the two SD days was observed on the expression of many genes involved in circadian rhythm regulation (i.e., *Arntl*, *Dbp*, *Npas2*, *Bhlhe41*,

Nr1d1, *Per3*, *Nfil3*), which is evocative of the finding that the expression of many of these clock genes is modulated by sleep restriction in human blood cells (Moller-Levet et al., 2013). Besides their implication in circadian regulation, these genes are also linked to neuronal and synaptic plasticity (Mongrain and Franken, 2013), therefore highlighting their capacity to affect brain recovery after injury. Accordingly, our findings support that, especially in the cerebral cortex, sleep loss may reprogram the transcriptome in a manner that could be deleterious to brain recovery after mTBI.

Alternatively, SD-dependent increase in *EfnA3* and decrease in *EphA4* expression in the cerebral cortex may suggest that sleep loss is not only detrimental to brain recovery after mTBI and could rather produce some positive effects. In fact, the lack of EphA4 was shown to be positively associated with neuronal reconstruction after spinal cord injury (Goldshmit et al., 2004), likely because EphA4 can mediate spine retraction (Murai and Pasquale, 2011). Importantly, EphA4 and EfnA3 have both been implicated in synaptic plasticity and neuron-glia interactions (Murai and Pasquale, 2011), emphasizing the relevance of changes in these elements after TBI. In the hippocampus, our observation that the expression of the plasticity elements *Arc* and *EfnA3* are restored to Sham levels in mTBI mice that were submitted to SD may also suggest a potential benefit of SD after injury. Moreover, SD affected fewer genes in the hippocampus of mTBI mice than in that of Sham mice. Nonetheless, the upregulation of *Arc* and *EfnA3* after injury might also be required to stimulate neuronal growth and plasticity to recover from injury, and the ablation of these changes by SD might have adverse effects. Of interest is also our observation that biological pathways linked to both Ephrin A signaling and serotonin receptor signaling are modified by SD in the cortex only in mTBI mice further suggesting vulnerability of plasticity and neurotransmission mechanisms after mTBI. Of course, the precise impact of these modifications on neuronal reconstruction and functional impact after mTBI will need to be addressed in future studies. This will also be required in order to reconcile findings from one study indicating that SD benefits the recovery of neurological function after TBI (Martinez-Vargas et al., 2012), and that of another study having shown that SD has neither an effect on NSS score nor on novel object recognition post-TBI (Rowe et al., 2014).

In conclusion, we confirmed a specific deficit in the capacity to sustain wakefulness in the initial hours following brain injury, and we uncover that this is associated with alterations in the dynamics of slow cortical activity during wakefulness. We also reveal

important changes in cerebral cortex activity across all vigilance states in the first days after mild brain injury and a preservation of the time course of NREMS delta activity. Importantly, our findings identified novel elements that could contribute to sleep/wake and ECoG modifications, elements supporting an implication of pathways linked to immune and glial functions. Moreover, our results suggest a brain area-specific impact of mTBI on all three types of glial cells in the central nervous system. Assessment of inter-hemispheric differences in these observations, shown to be important for several plasticity genes after TBI (Hick et al., 1999), and of their associations with changes in neuronal morphology (e.g., dendrite and spine number and shape) will help to understand the contribution of the identified elements to wakefulness and sleep phenotypes. Future studies should also consider the effect of time-of-day at which the injury is performed on brain gene expression since it was shown to impact on mortality rate (Martinez-Vargas et al., 2006). Finally, our data also expose several molecular routes by which sleep loss could crucially impact on brain recovery after a traumatic injury.

3.5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Odile Neyret and Gaétan Tremblay for help with sequencing, Éric Beaumont for help regarding the brain injury, Peter Meerlo for critical discussion of the data, Catherine Duclos and Erika Bélanger-Nelson for critical review of the manuscript, and Erika Bélanger-Nelson, Michèle Houde, Janine El Helou, Adeline Rachalski and Chloé Provost for help with SD and animal handling. This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CBI-127051), start-up funds from the Research Center of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, and salary awards from the Fonds de la Recherche du Québec – Santé (22210, 24742).

3.6 REFERENCES

- Abrous, D.N., Rodriguez, J., le Moal, M., Moser, P.C., Barnéoud, P., 1999. Effects of mild traumatic brain injury on immunoreactivity for the inducible transcription factors c-Fos, c-Jun, JunB, and Krox-24 in cerebral regions associated with conditioned fear responding. *Brain Res.* 826, 181-192.
- Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M., 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450-453.
- Amzica, F., Steriade, M., 2000. Integration of low-frequency sleep oscillations in corticothalamic networks. *Acta Neurobiol. Exp.* 60, 229-245.
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2014. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. bioRxiv: <http://dx.doi.org/10.1101/002824>
- Andrews, S., 2014. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Ayalon, L., Borodkin, K., Dishon, L., Kanety, H., Dagan, Y., 2007. Circadian rhythm sleep disorders following mild traumatic brain injury. *Neurology* 68, 1136-1140.
- Bachstetter, A.D., Rowe, R.K., Kaneko, M., Goulding, D., Lifshitz, J., Van Eldik, L.J., 2013. The p38 α MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 33, 6143-6153.
- Baumann, C.R., Bassetti, C.L., Valko, P.O., Haybaeck, J., Keller, M., Clark, E., Stocker, R., Tolnay, M., Scammell, T.E., 2009. Loss of hypocretin (orexin) neurons with traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 66, 555-559.
- Bazarian, J.J., Zhong, J., Blyth, B., Zhu, T., Kavcic, V., Peterson, D., 2007. Diffusion tensor imaging detects clinically important axonal damage after mild traumatic brain injury: a pilot study. *J. Neurotrauma.* 24, 1447-1459.
- Bellesi, M., Pfister-Genskow, M., Maret, S., Keles, S., Tononi, G., Cirelli, C., 2013. Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors. *J Neurosci.* 33, 14288-14300.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 57, 289-300.
- Blumbergs, P.C., Scott, G., Manavis, J., Wainwright, H., Simpson, D.A., McLean, A.J., 1995. Topography of axonal injury as defined by amyloid precursor protein and the sector scoring method in mild and severe closed head injury. *J. Neurotrauma* 12, 565-572.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- Borbély, A.A., 1982. A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiol.* 1, 195-204.

- Browne, K.D., Chen, X.H., Meaney, D.F., Smith, D.H., 2011. Mild traumatic brain injury and diffuse axonal injury in swine. *J. Neurotrauma* 28, 1747-1755.
- Buffo, A., Vosko, M.R., Ertürk, D., Hamann, G.F., Jucker, M., Rowitch, D., Götz, M., 2005. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18183-18188.
- Chaput, G., Giguère, J.F., Chauny, J.M., Denis, R., Lavigne, G., 2009. Relationship among subjective sleep complaints, headaches, and mood alterations following a mild traumatic brain injury. *Sleep Med.* 10, 713-716.
- Chen, Y., Constantini, S., Trembovler, V., Weinstock, M., Shohami, E., 1996. An experimental model of closed head injury in mice: Pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J. Neurotrauma* 13, 557-568.
- Cohen, [M.](#), [Oksenberg, A.](#), [Snir, D.](#), [Stern, M.J.](#), [Groswasser, Z.](#), 1992. Temporally related changes of sleep complaints in traumatic brain injured patients. [J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry](#) 55, 313-315.
- Colak, T., Cine, N., Bamac, B., Kurtas, O., Ozbek, A., Bicer, U., Sunnetci, D., Savlı, H., 2012. Microarray-based gene expression analysis of an animal model for closed head injury. *Injury* 43, 1264-1270.
- Crack, P.J., Gould, J., Bye, N., Ross, S., Ali, U., Habgood, M.D., Morganti-Kossmann, C., Saunders, N.R., Hertzog, P.J., Victorian Neurotrauma Research Group, 2009. The genomic profile of the cerebral cortex after closed head injury in mice: effects of minocycline. *J. Neural Transm.* 116, 1-12.
- Curie, T., Mongrain, V., Dorsaz, S., Mang, G.M., Emmenegger, Y., Franken, P., 2013. Homeostatic and circadian contribution to EEG and molecular state variables of sleep regulation. *Sleep* 36, 311-323.
- Deister, C. Schmidt, C.E., 2006. Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *J. Neural Eng.* 3, 172-179.
- Diekelmann, S., Born, J., 2010. The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 114-126.
- Duclos, C., Dumont, M., Blais, H., Paquet, J., Laflamme, E., de Beaumont, L., Wiseman-Hakes, C., Menon, D.K., Bernard, F., Gosselin, N., 2013. Rest-activity cycle disturbances in the acute phase of moderate to severe traumatic brain injury. *Neurorehabil. Neural Repair* 28, 472-482.
- Duclos, C., Dumont, M., Wiseman-Hakes, C., Arbour, C., Mongrain, V., Gaudreault, P.O., Khoury, S., Lavigne, G., Desautels, A., Gosselin, N., 2014. Sleep and wake disturbances following traumatic brain injury. *Pathol Biol (Paris)* 62, 252-261.
- El Helou, J., Bélanger-Nelson, E., Freyburger, M., Dorsaz, S., Curie, T., La Spada, F., Gaudreault, P.O., Beaumont, É., Pouliot, P., Lesage, F., Frank, M.G., Franken, P., Mongrain, V., 2013. Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9974-9979.

- Engel, S., Schluesener, H., Mittelbronn, M., Seid, K., Adjodah, D., Wehner, H.D., Meyermann, R., 2000. Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol.* 100, 313-322.
- Eroglu, B., Kimbler, D.E., Pang, J., Choi, J., Moskophidis, D., Yanasak, N., Dhandapani, K.M., Mivechi, N.F., 2014. Therapeutic inducers of the HSP70/HSP110 protect mice against traumatic brain injury. *J. Neurochem* in press.
- Fichtenberg, N.L., Millis, S.R., Mann, N.R., Zafonte, R.D., Millard, A.E., 2000. Factors associated with insomnia among post-acute traumatic brain injury survivors. *Brain Inj.* 14, 659-667.
- Flierl, M.A., Stahel, P.F., Beauchamp, K.M., Morgan, S.J., Smith, W.R., Shohami, E., 2009. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat. Protoc.* 4, 1328-1337.
- Franken, P., Dijk, D.J., Tobler, I., Borbély, A.A., 1991. Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am. J. Physiol.* 261, R198-R208.
- Franken, P., Chollet, D., Tafti, M., 2001. The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *J. Neurosci.* 21, 2610-2621.
- Gao, X., Chen, J., 2011. Mild traumatic brain injury results in extensive neuronal degeneration in the cerebral cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 183-191.
- Goldshmit, Y., Galea, M.P., Wise, G., Bartlett, P.F., Turnley, A.M., 2004. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *J. Neurosci.* 24, 10064-10073.
- Gosselin, N., Lassonde, M., Petit, D., Leclerc, S., Mongrain, V., Collie, A., Montplaisir, J., 2009. Sleep following sport-related concussions. *Sleep Med.* 10, 35-46.
- Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.Y., Abel, T., Haydon, P.G., Frank, M.G., 2009. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213-219.
- Hånell, A., Clausen, F., Djupsjö, A., Vallstedt, A., Patra, K., Israelsson, C., Larhammar, M., Björk, M., Paixão, S., Kullander, K., Marklund, N., 2012. Functional and histological outcome after focal traumatic brain injury is not improved in conditional EphA4 knockout mice. *J. Neurotrauma* 29, 2660-2671
- Hazra, A., Macolino, C., Elliott, M.B., Chin, J., 2014. Delayed thalamic astrocytosis and disrupted sleep-wake patterns in a preclinical model of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* June 25.
- He, Y., Jones, C.R., Fujiki, N., Xu, Y., Guo, B., Holder, J.L.Jr., Rossner, M.J., Nishino, S., Fu, Y.H., 2009. The transcriptional repressor DEC2 regulates sleep length in mammals. *Science* 325, 866-870.

- Helmy, A., De Simoni, M.G., Guilfoyle, M.R., Carpenter, K.L., Hutchinson, P.J., 2011. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. *Prog. Neurobiol.* 95, 352-372.
- Hicks, R.R., Martin, V.B., Zhang, L., Seroogy, K.B., 1999. Mild experimental brain injury differentially alters the expression of neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the hippocampus. *Exp. Neurol.* 160, 469-478.
- Higashida, T., Kreipke, C.W., Rafols, J.A., Peng, C., Schafer, S., Schafer, P., Ding, J.Y., Dornbos, D. 3rd, Li, X., Guthikonda, M., Rossi, N.F., Ding, Y., 2011. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 114, 92-101.
- Hou, Z., Luo, W., Sun, X., Hao, S., Zhang, Y., Xu, F., Wang, Z., Liu, B., 2012. Hydrogen-rich saline protects against oxidative damage and cognitive deficits after mild traumatic brain injury. *Brain Res. Bull.* 88, 560-565.
- Hou, L., Han, X., Sheng, P., Tong, W., Li, Z., Xu, D., Yu, M., Huang, L., Zhao, Z., Lu, Y., Dong, Y., 2013. Risk factors associated with sleep disturbance following traumatic brain injury: Clinical findings and questionnaire based study. *PLoS ONE* 8, e76087.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677-736.
- Huber, R., Tononi, G., Cirelli, C., 2007. Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis. *Sleep* 30, 129-139.
- Inglese, M., Makani, S., Johnson, G., Cohen, B.A., Silver, J.A., Gonen, O., Grossman, R.I., 2005. Diffuse axonal injury in mild traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study. *J. Neurosurg.* 103, 298-303.
- Junghans, D., Chauvet, S., Buhler, E., Dudley, K., Sykes, T., Henderson, C.E., 2004. The CES-2-related transcription factor E4BP4 is an intrinsic regulator of motoneuron growth and survival. *Development* 131, 4425-4434.
- Kernie, S.G., Parent, J.M., 2010. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 37, 267-274.
- Khoury, S., Chouchou, F., Amzica, F., Giguère, J.F., Denis, R., Rouleau, G.A., Lavigne, G.J., 2013. Rapid EEG activity during sleep dominates in mild traumatic brain injury patients with acute pain. *J. Neurotrauma* 30, 633-641.
- Kim, D., Perte, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, R36.
- Krueger, J.M., Rector, D.M., Roy, S., Van Dongen, H.P., Belenky, G., Panksepp, J., 2008. Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 910-919.

- Krueger, J.M., Clinton, J.M., Winters, B.D., Zielinski, M.R., Taishi, P., Jewett, K.A., Davis, C.J., 2011. Involvement of cytokines in slow wave sleep. *Prog. Brain Res.* 193, 39-47.
- Kumar, A., Stoica, B.A., Sabirzhanov, B., Burns, M.P., Faden, A.I., Loane, D.J., 2013. Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. *Neurobiol. Aging* 34, 1397-1411.
- Leemburg, S., Vyazovskiy, V.V., Olcese, U., Bassetti, C.L., Tononi, G., Cirelli, C., 2010. Sleep homeostasis in the rat is preserved during chronic sleep restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 15939-15944.
- Lerman, B.J., Hoffman, E.P., Sutherland, M.L., Bouri, K., Hsu, D.K., Liu, F.T., Rothstein, J.D., Knoblach, S.M., 2012. Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav.* 2, 563-575
- Lim, M.M., Elkind, J., Xiong, G., Galante, R., Zhu, J., Zhang, L., Lian, J., Rodin, J., Kuzma, N.N., Pack, A.I., Cohen, A.S., 2013. Dietary therapy mitigates persistent wake deficits caused by mild traumatic brain injury. *Sci. Transl. Med.* 5, 215ra173.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *bioRxiv*: <http://dx.doi.org/10.1101/002832>
- Luo, P., Chen, T., Zhao, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liu, W., Li, S., Rao, W., Dai, S., Yang, J., Fei, Z., 2014. Postsynaptic scaffold protein Homer 1a protects against traumatic brain injury via regulating group I metabotropic glutamate receptors. *Cell Death Dis.* 5, e1174.
- Mahmood, O., Rapport, L.J., Hanks, R.A., Fichtenberg, N.L., 2004. Neuropsychological performance and sleep disturbance following traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 19, 378-390.
- Maret, S., Dorsaz, S., Gurcel, L., Pradervand, S., Petit, B., Pfister, C., Hagenbuchle, O., O'Hara, B.F., Franken, P., Tafti, M., 2007. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20090-20095.
- Martinez-Vargas, M., Gonzalez-Rivera, R., Soto-Nuñez, M., Cisneros-Martinez, M., Huerta-Saquero, A., Morales-Gomez, J., Molina-Guarneros, J., Navarro, L., 2006. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations effect of cystatin C. *Neurosci. Lett.* 400, 21-24.
- Martinez-Vargas, M., Estrada Rojo, F., Tabla-Ramon, E., Navarro-Argüelles, H., Ortiz-Lailzon, N., Hernández-Chávez, A., Solis, B., Martínez Tapia, R., Perez Arredondo, A., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Nava-Talavera, K., Navarro, L., 2012. Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat. *Neurosci. Lett.* 529, 118-122.
- Massart, R., Freyburger, M., Suderman, M., Paquet, J., El Helou, J., Belanger-Nelson, E., Rachalski, A., Koumar, O.C., Carrier, J., Szyf, M., Mongrain, V., 2014. The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. *Transl. Psychiat.* 4, e347.

- McAllister, T.W., 2011. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin. Neurosci.* 13, 287-300.
- McAllister, T.W., Tyler, A.L., Flashman, L.A., Rhodes, C.H., McDonald, B.C., Saykin, A.J., Tosteson, T.D., Tsongalis, G.J., Moore, J.H., 2012. Polymorphisms in the brain-derived neurotrophic factor gene influence memory and processing speed one month after brain injury. *J. Neurotrauma* 29, 1111-1118.
- Meerlo, P., Mistlberger, R.E., Jacobs, B.L., Heller, H.C., McGinty, D., 2009. New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Med. Rev.* 13, 187-194.
- Mirabelli-Badenier, M., Braunersreuther, V., Viviani, G.L., Dallegri, F., Quercioli, A., Veneselli, E., Mach, F., Montecucco, F., 2011. CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.* 105, 409-420.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., Okamura, H., 2001. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 15, 995-1006.
- Möller-Levet, C.S., Archer, S.N., Bucca, G., Laing, E.E., Slak, A., Kabiljo, R., Lo, J.C., Santhi, N., von Schantz, M., Smith, C.P., Dijk, D.J., 2013. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E1132-E1141.
- Mongrain, V., Franken, P., 2013. Genetic interaction between circadian and homeostatic regulation of sleep. In: *The genetic basis of sleep and sleep disorders*. Eds., Paul Shaw, Mehdi Tafti, Michael Thorpy, Cambridge University Press, Cambridge, chapter 15, pp. 147-161.
- Mongrain, V., Hernandez, S.A., Pradervand, S., Dorsaz, S., Curie, T., Hagiwara, G., Gip, P., Heller, H.C., Franken, P., 2010. Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep* 33, 1147-1157.
- Murai, K.K., Pasquale, E.B., 2011. Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses. *Glia* 59, 1567-1578.
- Nelson, A.B., Faraguna, U., Tononi, G., Cirelli, C., 2010. Effects of anesthesia on the response to sleep deprivation. *Sleep* 33, 1659-1667.
- Ohlmann, K.K., O'Sullivan, M.I., 2009. The costs of short sleep. *AAOHN J.* 57, 381-385.
- Oliveros, J.C., 2007. Venny: An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Orff, H.J., Ayalon, L., Drummond, S. P., 2009. Traumatic brain injury and sleep disturbance: a review of current research. *J. Head Trauma Rehabil.* 24, 155-165.
- Ouellet, M.C., Savard, J., Morin, C.M., 2004. Insomnia following traumatic brain injury: a review. *Neurorehabil. Neural Repair* 18, 187-196.
- Pellegrino, R., Kavakli, I.H., Goel, N., Cardinale, C.J., Dinges, D.F., Kuna, S.T., Maislin, G., Van Dongen, H.P., Tufik, S., Hogenesch, J.B., Hakonarson, H., Pack, A.I., 2014.

- A novel BHLHE41 variant is associated with short sleep and resistance to sleep deprivation in humans. *Sleep* 37, 1327-1336.
- Pillar, G., Averbooch, E., Katz, N., Peled, N., Kaufman, Y., Shahar, E., 2003. Prevalence and risk of sleep disturbances in adolescents after minor head injury. *Pediatr. Neurol.* 29, 131-135.
- Postler, E., Lehr, A., Schluesener, H., Meyermann, R., 1997. Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19, 27-34.
- Ramesh, G., MacLean, A.G., Philipp, M.T., 2013. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm.* 480739.
- Rao, V., Bergey, A., Hill, H., Efron, D., McCann, U., 2011. Sleep disturbance after mild traumatic brain injury: indicator of injury? *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 23, 201-205.
- Redell, J.B., Moore, A.N., Grill, R.J., Johnson, D., Zhao, J., Liu, Y., Dash, P.K., 2013. Analysis of functional pathways altered after mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 30, 752-764.
- Rostami, E., Krueger, F., Zoubak, S., Dal Monte, O., Raymont, V., Pardini, M., Hodgkinson, C.A., Goldman, D., Risling, M., Grafman, J., 2011. BDNF polymorphism predicts general intelligence after penetrating traumatic brain injury. *PLoS One* 6, e27389.
- Rowe, R.K., Striz, M., Bachstetter, A.D., Van Eldik, L.J., Donohue, K.D., O'Hara, B.F., Lifshitz, J., 2013. Diffuse brain injury induces acute post-traumatic sleep. *PLoS One* 8, e82507.
- Rowe, R.K., Harrison, J.L., O'Hara, B.F., Lifshitz, J., 2014. Diffuse brain injury does not affect chronic sleep patterns in the mouse. *Brain Inj.* 28, 504-510.
- Schiehser, D.M., Twamley, E.W., Liu, L., Matevosyan, A., Filoteo, J.V., Jak, A.J., Orff, H.J., Hanson, K.L., Sorg, S.F., Delano-Wood, L., 2014. The relationship between postconcussive symptoms and quality of life in veterans with mild to moderate traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* in press.
- Stahel, P.F., Shohami, E., Younis, F.M., Kariya, K., Otto, V.I., Lenzlinger, P.M., Grosjean, M.B., Eugster, H.P., Trentz, O., Kossmann, T., Morganti-Kossmann, M.C., 2000. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 20, 369-380.
- Stahel, P.F., Flierl, M.A., Morgan, B.P., Persigehl, I., Stoll, C., Conrad, C., Touban, B.M., Smith, W.R., Beauchamp, K., Schmidt, O.I., Ertel, W., Leinhase, I., 2009. Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice. *J. Neuroinflammation* 6, 2.

- Theus, M.H., Ricard, J., Bethea, J.R., Liebl, D.J., 2010. EphB3 limits the expansion of neural progenitor cells in the subventricular zone by regulating p53 during homeostasis and following traumatic brain injury. *Stem Cells* 28, 1231-1242.
- Vos, P.E., Lamers, K.J., Hendriks, J.C., van Haaren, M., Beems, T., Zimmerman, C., van Geel, W., de Reus, H., Biert, J., Verbeek, M.M., 2004. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology* 62, 1303-1310.
- Vyazovskiy, V.V., Olcese, U., Hanlon, E.C., Nir, Y., Cirelli, C., Tononi, G., 2011. Local sleep in awake rats. *Nature* 472, 443-447.
- Willie, J.T., Lim, M.M., Bennett, R.E., Azarion, A.A., Schwetye, K.E., Brody, D.L., 2012. Controlled cortical impact traumatic brain injury acutely disrupts wakefulness and extracellular orexin dynamics as determined by intracerebral microdialysis in mice. *J. Neurotrauma* 29, 1908-1921.
- Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2010. Vitamin E Protects Against Oxidative Damage and Learning Disability After Mild Traumatic Brain Injury in Rats. *Neurorehabil. Neural Repair* 24, 290-298.
- Yokobori, S., Hosein, K., Burks, S., Sharma, I., Gajavelli, S., Bullock, R., 2013. Biomarkers for the clinical differential diagnosis in traumatic brain injury--a systematic review. *C.N.S. Neurosci. Ther.* 19, 556-565.
- Ziegler, G., Prinz, V., Albrecht, M.W., Harhausen, D., Khojasteh, U., Nacken, W., Endres, M., Dirnagl, U., Nietfeld, W., Trendelenburg, G., 2009. Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1198-1204

3.7 FIGURE LEGEND

Fig. 1: (A) Schematic view of the ECoG/EMG recording protocol. mTBI was performed between ZT8 and ZT11 and was immediately followed by an electrode implantation surgery. The morning of the next day, mice were cabled around 15min before ZT0 and ECoG/EMG were recorded continuously for 48 hours starting at light onset. Sham control mice were recorded in parallel, and recordings were performed in groups of 4 to 6 mice. Grey bars indicate undisturbed/spontaneous wakefulness and sleep behavior (same in B), and red bars indicate ECoG/EMG recorded undisturbed/spontaneous wakefulness and sleep behavior. Light grey areas indicate dark periods (same in B). (B) Schematic view of the gene expression protocol. Mice were initially divided into two different groups in which animals were either submitted to mTBI or Sham surgery between ZT8 and ZT11. For each of these conditions, half of the animals were submitted to two consecutive days of 6h sleep deprivation (SD), taking place between ZT0 and ZT6. All animals were then sacrificed on the morning of the third day for brain area sampling. (C) Neurological Severity Scale (NSS) score from an initial cohort of animals (n = 10 mTBI and 8 Sham). Only mTBI mice showed a significant increase in NSS score 6h after injury in comparison to before injury ($t = 3.2$, $p < 0.01$ indicated by the star).

Fig. 2: (A) Forty-eight-hour time course of vigilance state duration in mTBI and Sham mice measured using ECoG/EMG recording. The upper panel shows the time course of wakefulness, the middle panel that of NREMS and the lower panel that of REMS. The time course of the three vigilance states did not significantly differ between mTBI and Sham mice on both Day 1 (interaction: wakefulness $F_{23,276} = 0.7$, $p = 0.9$; NREMS $F_{23,276} = 0.7$, $p = 0.9$; REMS $F_{23,276} = 0.8$, $p = 0.8$) and Day 2 (interaction: wakefulness $F_{23,276} = 0.7$, $p = 0.8$; NREMS $F_{23,276} = 0.7$, $p = 0.8$; REMS $F_{23,276} = 1.0$, $p = 0.5$). The total duration of vigilance states was also similar between mTBI and Sham mice (Condition effect wakefulness: $F_{1,12} < 1.3$, $p > 0.2$; NREMS: $F_{1,12} < 1.9$, $p > 0.2$; REMS: $F_{1,12} < 0.7$, $p > 0.4$). Grey areas indicate dark periods (same in B). (B) Number of long bouts of wakefulness (16min) in mTBI and Sham mice averaged for 24h, 12-h light, and 12-h dark periods separately for the first and the second recorded days. A significant Condition effect (mTBI vs. Sham) was found for 24h and 12-h dark period only for the first recorded day ($t \geq 2.3$, $p < 0.05$ indicated by stars; Day 1 12-h light period: $t = 1.3$, $p = 0.2$; Day 2: $t < 0.8$, $p > 0.4$).

Fig. 3: (A) Wakefulness (upper panels), NREMS (middle panels) and REMS (bottom panels) relative spectral power averaged for 24h per 0.25Hz-bin between 0.75 to 25Hz separately for Day 1 and Day 2 in mTBI and Sham mice. Significant group differences were observed only in NREMS for Day 1 for three bins around 5Hz ($t \geq 2.2$, $p < 0.05$). For Day 2, significant group effects ($t \geq 2.2$, $p < 0.05$) were observed for wakefulness for Hz-bins around 5Hz and at 16.25 and 20.25Hz, for NREMS between 3.5 and 6.75Hz and between 14.75 and 25Hz, and for REMS between 3.25 and 5Hz and between 21.75 and 23Hz. Significant differences between mTBI and Sham mice are represented by black bars above the x-axis (thin bars: $p < 0.05$; thick bars: $p < 0.01$). Inserts show magnifications of indicated spectra with significant differences. (B) Forty-eight-hour time course of relative delta activity during wakefulness (upper panel) and NREMS (bottom panel) in mTBI and Sham mice. A Condition (mTBI vs. Sham) by Interval interaction was found for relative delta activity during wakefulness ($F_{35,420} = 1.8$, $p = 0.02$). Stars indicate significant differences between mTBI and Sham mice for indicated points ($p < 0.05$, simple effect analysis). No significant Condition by Interval interaction or Condition effect was found for relative delta activity during NREMS (interaction: $F_{35,420} = 1.0$, $p = 0.5$; condition: $F_{1,12} = 1.8$, $p = 0.2$). Grey areas indicate dark periods.

Fig. 4: Effect of mTBI and two consecutive days of 6h sleep deprivation (SD) on the expression of plasticity and other target genes measured by qPCR on the third morning after surgery in the cerebral cortex and hippocampus. In the cerebral cortex, no significant interaction between Condition (mTBI vs. Sham) and Treatment (SD vs. Control [Ctrl]) and no significant Condition effect was found. Significant Treatment (SD vs. Control) effect was found for *Arc*, *Bdnf*, *Dnajb5*, *Fos*, *Homer1a*, *EfnA3* and *EphA4* ($F_{1,33} \geq 4.3$, $p < 0.05$, indicated by +). In the hippocampus, a significant Condition by Treatment interaction was found for *Arc* and *EfnA3* ($F_{1,33} \geq 4.6$, $p < 0.04$, indicated by stars), and a tendency for Condition by Treatment interaction was observed for *Fgf1* ($F_{1,33} = 2.6$, $p = 0.1$). No significant Condition effect was found, but a significant Treatment (SD vs. Control) effect was found for *EfnB3* ($F_{1,33} = 8.6$, $p < 0.01$ indicated by +), and a tendency for a significant Treatment effect was observed for *Fos* ($F_{1,33} = 3.4$, $p = 0.07$).

Fig. 5: Venn diagrams (upper panels) and heatmap representations (lower panels) of genes differentially expressed in mTBI and Sham mice after two days of 6h sleep deprivation (SD) in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) as measured using

high-throughput sequencing (RNA-Seq). Venn diagrams show the overlap between genes differentially expressed (FDR < 0.05) in mTBI and Sham mice. In the cerebral cortex, 25.6% of genes differentially expressed after SD in mTBI mice overlap with those differentially expressed in Sham mice, whereas 44% of those in Sham mice overlap with those of mTBI mice. For the hippocampus, 18.2% of genes differentially expressed after SD in mTBI mice overlap with those differentially expressed in Sham mice, while only 4.2% of those in Sham mice overlap with that of mTBI mice. Heatmaps represent the expression of the same transcripts with significant differential expression after SD in mTBI and Sham mice, separately sorted according to the direction of the change with SD. For each condition (mTBI and Sham), columns refer to three pools of RNA of three control (C) and three SD mice (total nine per group). Transcripts were ordered by hierarchical clustering (complete linkage). (C and D) qPCR validations of the effect of mTBI and of two consecutive days of 6h SD on the expression of selected transcripts on the third morning after surgery in the cerebral cortex and hippocampus. (C) In the cerebral cortex, significant Condition effects (mTBI vs. Sham, indicated by stars) were observed for *Ccl3*, *Cxcl5*, *Gfap* and *S100a8* ($F_{1,33} \geq 4.3$, $p < 0.05$). A significant Treatment effect (SD vs. Control [Ctrl], indicated by +) was observed for *Nfil3* ($F_{1,33} \geq 34.6$, $p < 0.001$). A trend for Condition by Treatment interaction was found for *Gfap* ($F_{1,33} = 2.6$, $p = 0.1$). (D) In the hippocampus, significant Condition effects (mTBI vs. Sham, indicated by stars) were observed for *Ccl3*, *Cxcl5*, *Olig2* and *Gfap* ($F_{1,33} \geq 8.2$, $p < 0.05$). A significant Treatment effect (SD vs. Control, indicated by +) was observed for of *Nfil3* ($F_{1,33} = 15.1$, $p < 0.001$). No Condition by Treatment interaction was found for qPCR validation in the hippocampus.

Fig. S1: RNA-Seq quantification of the effect of mTBI and of two consecutive days of 6h sleep deprivation (SD) on the expression of *Bhlhe41* on the third morning after surgery in the cerebral cortex and hippocampus. A significant Treatment effect (SD vs. Control [Ctrl], indicated by +) was observed for both the cerebral cortex ($F_{1,8} = 69.1$, $p < 0.0001$) and the hippocampus ($F_{1,8} = 27.2$, $p < 0.001$). A tendency for a significant Condition (mTBI vs. Sham) by Treatment interaction was found for the hippocampus ($F_{1,8} = 4.3$, $p = 0.07$), indicating that the SD-dependent increase tended to be more important in mTBI than in Sham mice. No Condition effect was observed.

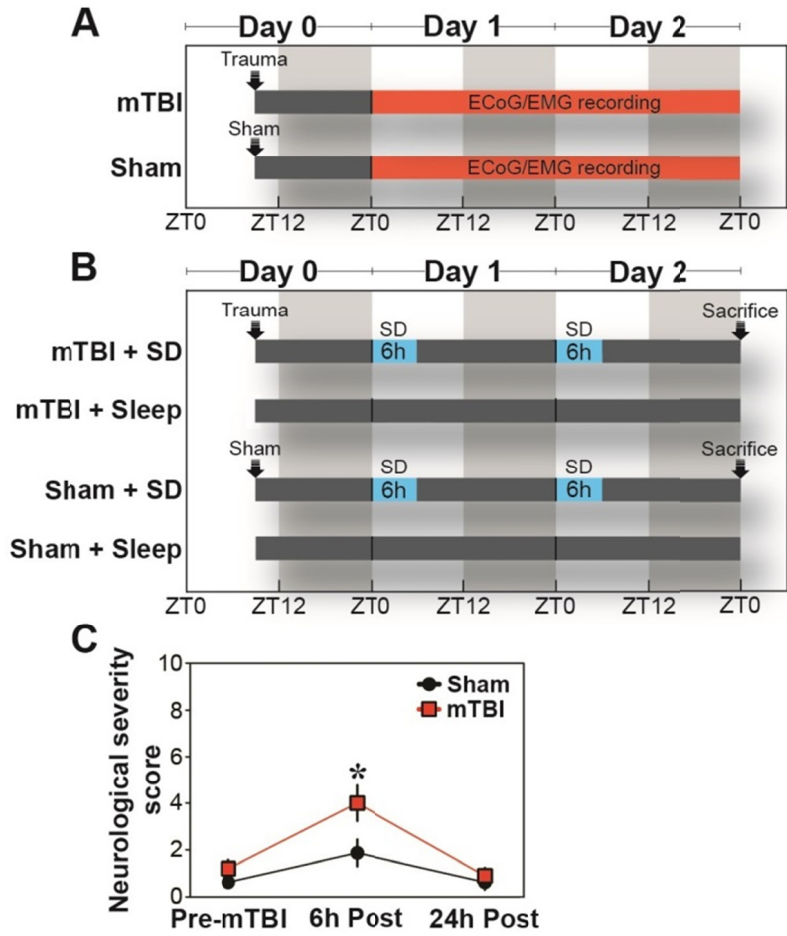


Figure 2

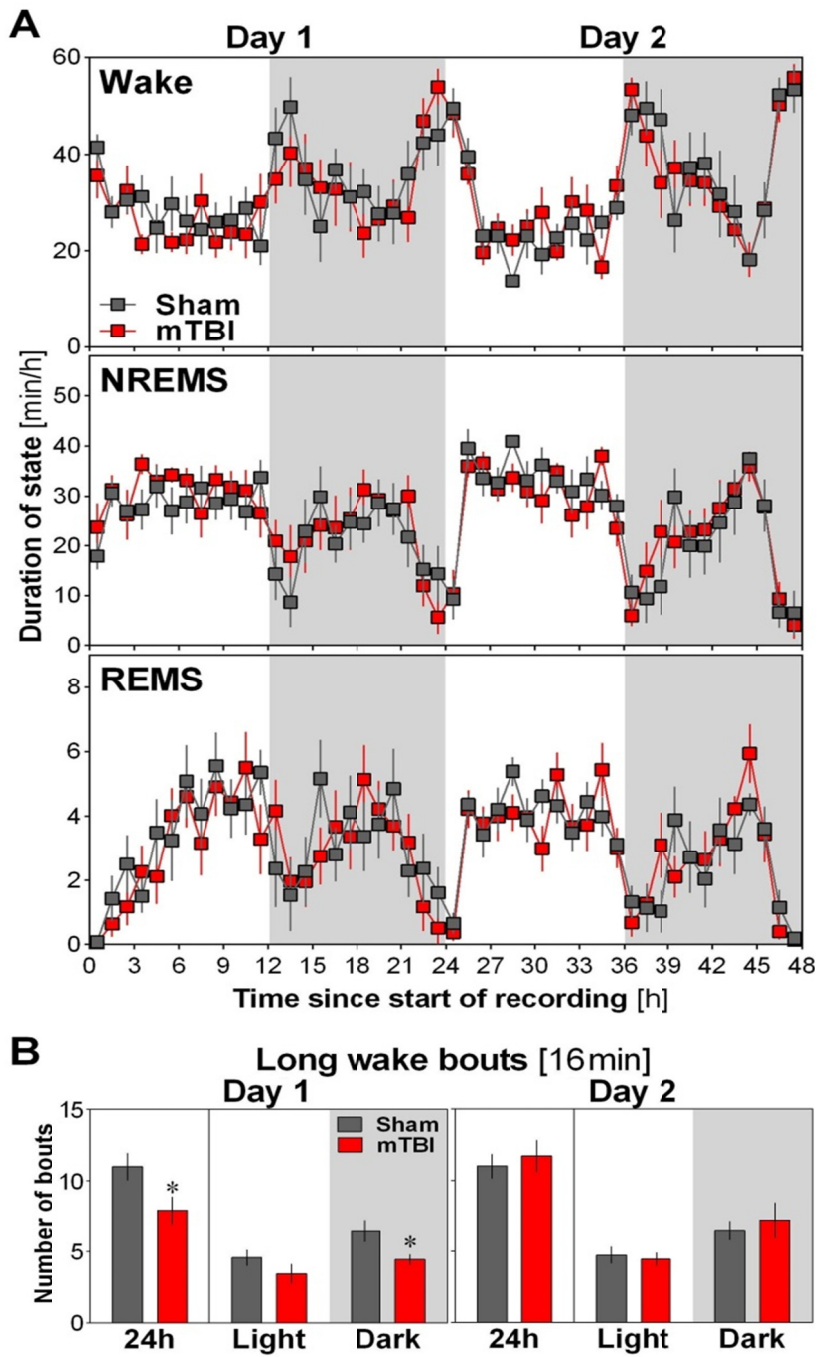


Figure 3

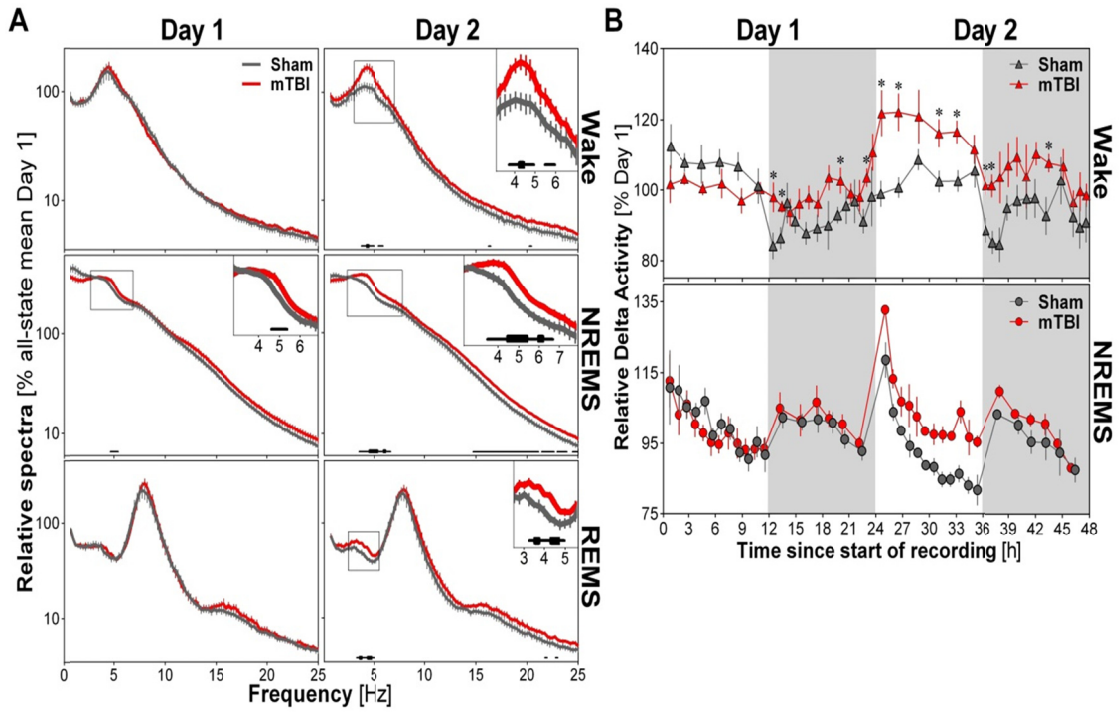


Figure 4

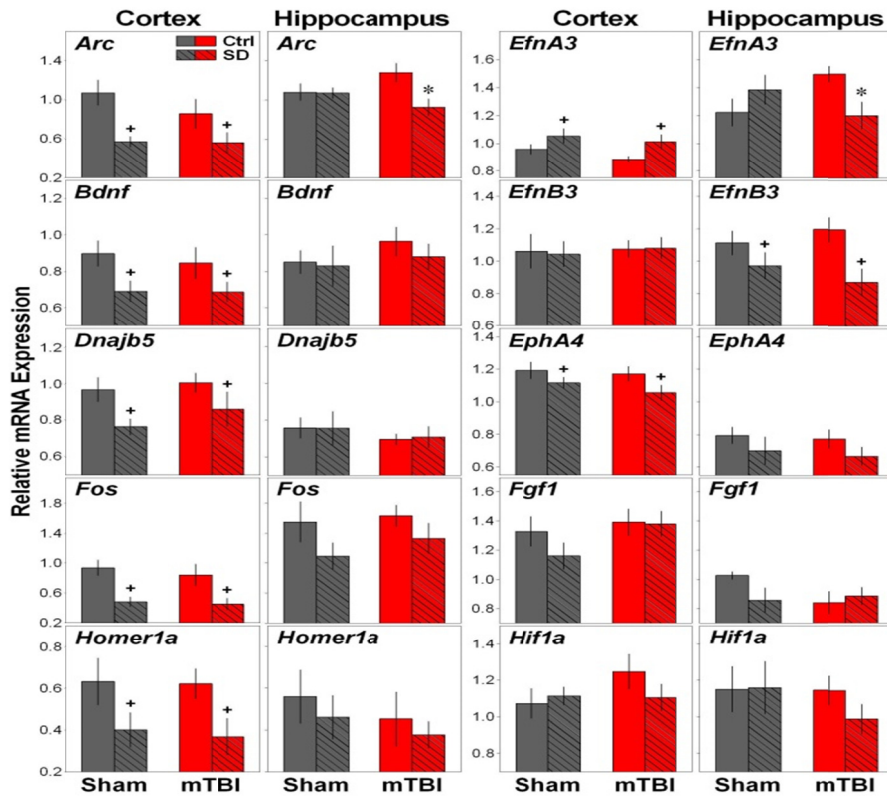
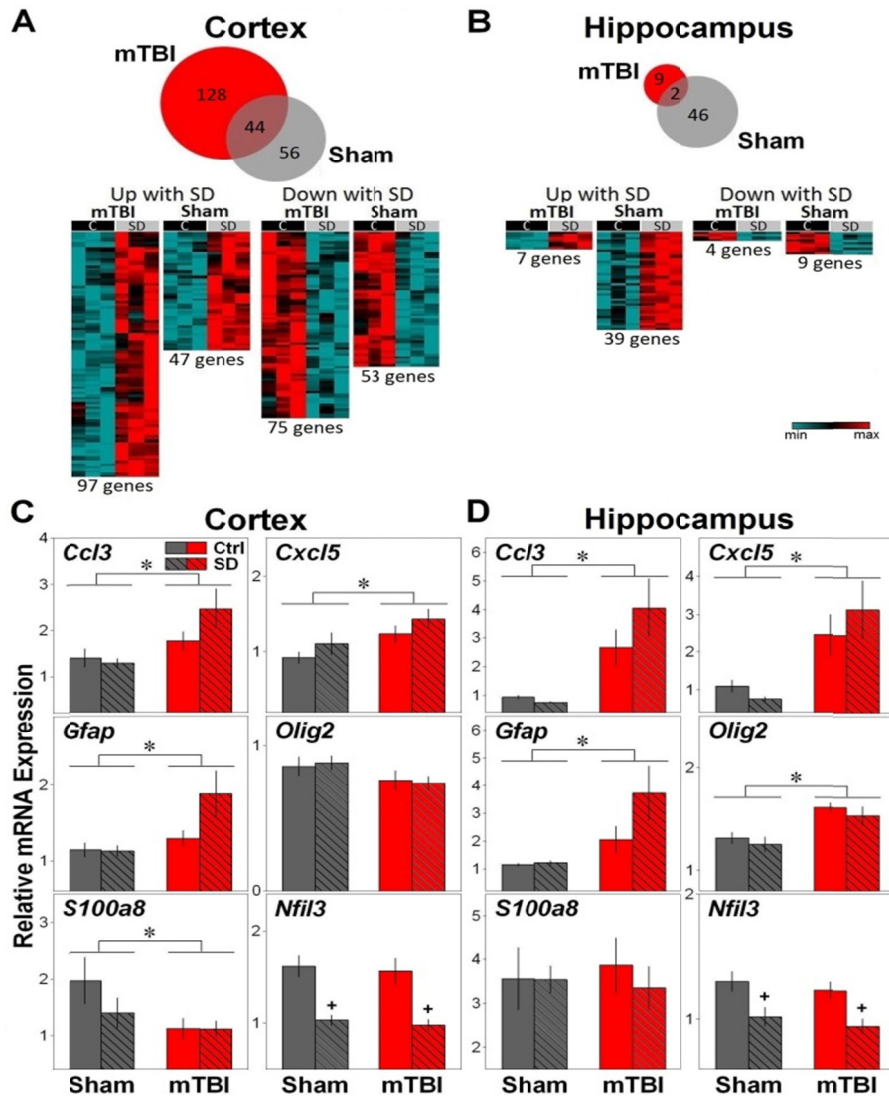


Figure 5



Chapitre 4 : Discussion

4.1 Rappel des principaux résultats

L'objectif principal de ce mémoire était d'étudier l'impact du traumatisme crânio-cérébral léger (TCL) sur l'architecture du sommeil durant les premiers jours suivant le TCL. D'autre part, nous avons voulu tester l'effet de privations de sommeil (PS) pendant 2 jours consécutifs sur la récupération en quantifiant l'expression de gènes associés au sommeil et également marqueurs moléculaires de plasticité synaptique (*Homer1a*, *Hif1a*, *Arc*, *Fos*, *Bdnf*, *EphA4*, *EphB2*, *EfnA3*, *EfnB2*, *EfnB3*, *DnajB5*, *Fgf1*).

La quantification de la durée des états de vigilances chez les souris TCL et Sham durant les premières 48 heures post-TCL a montré que les souris TCL n'étaient pas capables de maintenir l'état d'éveil pendant des longues périodes de 16 min au cours des premières 24 heures post-TCL, et surtout dans la deuxième moitié de la journée qui correspond à leur période active. Aussi, nous avons constaté des changements dans l'activité du cortex cérébral pour différentes fréquences : delta, thêta et bêta dans les trois états de vigilance. De façon intéressante, nous avons observé que le TCL augmente l'activité delta (1-4 Hz) pendant l'éveil. Bien que les souris Sham expriment plus de delta en période de lumière que dans l'obscurité pendant l'éveil, les souris TCL perdent cette différence jour-nuit. Ce qui indique que le TCL altère la dynamique de l'activité delta pendant l'éveil.

D'autre part, le séquençage complet du génome du cortex et d'hippocampe nous a permis de constater que ces changements électrophysiologiques sont associés à des modifications dans l'expression d'éléments modulateurs de la réponse inflammatoire, et surtout des changements dans les cellules gliales spécifiquement dans le cortex et l'hippocampe. Ces changements appuient notre hypothèse de départ supposant que le TCL induit des changements sur l'expression des gènes. En effet, nos données montrent que deux jours consécutifs de veille forcée après TCL affectent l'expression des gènes, en particulier des gènes impliqués dans la plasticité neuronale, la fonction synaptique et la régulation du rythme circadien. De plus, les résultats d'ARN-Seq et de qPCR montrent que le TCL induit des changements considérables dans l'expression de marqueurs de l'inflammation et d'activation des cellules gliales, avec une augmentation de l'expression des deux chimiokines *Ccl3* et *Cxcl5* dans le cortex et dans l'hippocampe.

Dans notre étude, nous avons examiné l'effet du TCL sur l'évolution de l'activité cérébrale par la mesure de l'ECOG pendant le sommeil des premiers jours suivant

l'impact. Le choix d'un modèle de traumatisme sur crâne fermé (closed head injury) a permis de garder le crâne intact pour effectuer la chirurgie d'implantation des électrodes ECoG/EMG juste après la chirurgie TCL. Toutefois, la récupération suite à la chirurgie pourrait masquer des différences additionnelles entre les groupes TCL et Sham. Enfin, nous pensons que nos résultats ajoutent des données importantes à la littérature sur les TCC, qui manquait une analyse détaillée de l'évolution de l'activité EEG immédiatement après TCC et la corrélation des changements électrophysiologiques avec un profil d'expression de gènes suite à la PS post-TCL. Dans cette discussion, nous allons élaborer davantage l'importance des résultats présentés dans l'article et leur pertinence.

4.2 Effet du TCL sur le sommeil

4.2.1 Sommeil chez rongeurs TCL. Similarités et différences

En utilisant le modèle de traumatisme sur crâne fermé (closed head injury) chez la souris, nous avons induit un TCL par chute de poids "weight drop" (Fleirl et al., 2009) pour déterminer l'effet immédiat d'un traumatisme cérébral léger sur l'évolution de l'EEG. Notre étude a permis de caractériser l'architecture de sommeil dans les premières 48 h. Alors que le sommeil post-traumatique dans notre modèle montre de nombreuses caractéristiques similaires au sommeil normal, il semble que l'éveil soit le plus affecté suite au dommage TCL. En effet, notre observation d'un déficit dans la capacité de maintenir l'éveil au cours des premières heures post-TCL est en accord avec d'autres études ayant observé l'apparition d'un problème de l'éveil après le TCL, que ce soit en immédiat ou après quelques semaines (Lim et al., 2013; Willie et al., 2012).

Contrairement à nos observations d'un sommeil normal, Rowe et son groupe ont montré des changements dans le phénotype du sommeil post-TCL, qui se manifestent par l'induction excessif du sommeil post-traumatique (Rowe et al., 2013; 2014). Cette étude a utilisé un système de cage non invasif pour l'enregistrement de sommeil, pour éviter les effets des anesthésiques qu'une intervention chirurgicale d'implantation d'électrodes EEG nécessite normalement. En revanche, la distinction des stades de sommeil NREM et REM s'avère impossible dans leur étude. Ces différences entre nos résultats sont, probablement, dues au choix de modèle de TCL, ou bien à la méthodologie d'enregistrement de sommeil (EEG/cages piézoélectriques) ou l'effet de la chirurgie qui risque de masquer des effets durant la première journée.

Il est intéressant de noter que l'éveil des souris dans les premiers jours post-TCL est semblable en partie au comportement des souris après une PS où ils ont tendance à dormir avec une incapacité de maintenir l'éveil (Huber et al., 2000). Ceci pourrait suggérer que le rythme circadien est affecté par le TCC, vu son rôle dans le maintien d'un cycle éveil/sommeil normal (Boone et al., 2012). Une étude sur des rats ayant subi le même modèle de TCL que celui utilisé dans la présente étude, avait observé que 48h de privation de lumière en combinaison avec un supplément de mélatonine a produit un effet neuroprotecteur significatif dans le cerveau des rats et que seul le groupe TCL soumis à 48 h d'obscurité constante avait une augmentation significative dans la puissance de l'EEG dans l'activité delta (Ucar et al., 2005). Ensemble, ces données appuient que le TCL déclenche des mécanismes qui diminuent la capacité de maintenir l'éveil et qui augmentent les longues périodes de sommeil (Rowe et al., 2013; 2014). Nous allons discuter de ces changements moléculaires avec plus de détails plus tard (**Section 4.3**). Aussi, il est intéressant de constater que ces observations sont en accord avec l'hypothèse évoquée par Lim et son groupe, suggérant que les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (Branched Chain Amino Acids (BCAA)), qui sont des acides aminés essentiels, peuvent restaurer l'activité des neurones orexine connues pour leur rôle dans la consolidation de l'éveil. Les acides aminés BCAA sont également les principaux précurseurs de synthèse de novo du glutamate (Cole et al., 2009). Une telle intervention pourrait ultimement rétablir l'excitabilité du réseau orexine ainsi que l'éveil. Nous allons discuter plus tard (**Section 4.2.2.2**) de l'implication et l'importance de ces neurones dans la neurophysiologie de l'éveil.

4.2.2 Sommeil des patients TCL. Similarités et différences

Chez l'humain, les troubles du sommeil, y compris la somnolence diurne excessive et l'insomnie, ont été signalées comme des conséquences persistantes après la commotion cérébrale (Baumann et al., 2007). Cependant, peu d'études ont rapporté des observations sur les troubles de sommeil immédiatement après TCL. La majorité des données disponibles portent sur les troubles chroniques du sommeil, sans déceler ce qui se passe dans l'architecture de sommeil immédiatement quand le patient est hospitalisé. Il est important d'enrichir la littérature par des données sur le sommeil post-traumatique durant les premiers jours suivant l'impact, car le sommeil pourrait être très important immédiatement après le dommage, pour accomplir sa tâche de réparation et aider à la récupération des fonctions cérébrales et même pour prévenir d'autres troubles

conséquents, tel que les troubles cognitives et de performance. Parmi les séquelles les plus fréquentes post-TCL on retrouve notamment la douleur et les maux de tête, qui semblent être directement associés à des changements dans de sommeil (Khoury et al., 2013; Theeler et al., 2013).

Nos résultats suggèrent que le déficit est principalement observé dans la phase active, et qu'il y avait ainsi une perte de rythmicité journalière normale. Notamment, dans l'expression des ondes delta pendant l'éveil, qui était plus exprimé pendant l'éveil. En fait, le déficit dans le maintien de l'éveil est comparable aux études rapportant une somnolence diurne excessive chez les patients TCC (Castriotta et al., 2007; Baumann 2012), ce qui montre qu'effectivement l'aspect le plus altéré suite à ce dommage est le maintien de l'éveil. Nos résultats ne montrent pas de déficit marqué dans le sommeil, et le déficit observé au niveau de l'éveil n'implique pas nécessairement une altération du sommeil. Toutefois, si le déficit de l'éveil persistera à long terme, il pourrait exacerber des altérations dans l'architecture de sommeil plus tard.

Dans les études sur les TS et la récupération cognitive post-TCC, les patients ont été soumis à un test (maintenance of wakefulness test) qui permet d'évaluer leur capacité de rester éveillé. Les résultats de cette étude montrent que les patients TCC s'endormaient pendant le test même lorsqu'ils prennent leur dose régulière de modafinil (stimulant utilisé dans le traitement de l'hypersomnie) (Fung et al., 2011; Wiseman-Hakes et al., 2013). Ceci suggère que ce traitement pharmaceutique actuel n'attaque pas forcément la bonne cible de la somnolence diurne excessive suite au TCL. Il serait donc pertinent de se servir de ces données cliniques en combinaison avec des données fondamentales, tels que les neurones orexines, pour permettre de démystifier les mécanismes secondaires et éventuellement identifier la ou les bonnes cibles thérapeutiques.

Dans la présente étude, nous n'avons pas observé une augmentation significative dans la quantité de sommeil au cours des premières 48 h post-TCL. Pourtant, des observations d'une augmentation dans la quantité de sommeil ont été rapportés chez les patients TCC mais à long terme (Castriotta et al., 2007). D'autre part, l'analyse de l'activité corticale nous a permis de quantifier l'activité spectrale au cours de différentes fréquences détectées à l'EEG pendant les premières 48h post-TCL. Nous avons observé des changements dans différentes fréquences à savoir le delta, thêta et bêta

dans l'éveil, le sommeil REM et NREM. Plus précisément, les souris TCL avaient une activité spectrale plus élevée que les souris Sham dans le thêta (4-8Hz) et bêta (16-25 Hz) et ceci dans les trois états de vigilance. Le changement observé au niveau des ondes bêta concorde avec les données existantes qui indiquent une augmentation marquée des ondes rapides chez des patients TCL. Plus particulièrement, une étude ayant pour objectif d'étudier les marqueurs neurophysiologiques de la reprise de conscience chez des patients TCC a comparé la dynamique des changements cliniques et l'activité cérébrale EEG, et a conclu que l'EEG des patients TCC révèle une activité thêta élevée (Odinak et al., 2014). Cette augmentation pourrait être en elle-même indicative d'un sommeil altéré (Antal et Paulus., 2010). Généralement, les ondes bêta, sont présentes dans l'état le plus actif du cerveau, ainsi durant l'éveil. La présence des ondes beta durant le sommeil NREM peut donc être responsable en partie d'une lacune dans la récupération. Ce changement dans l'activité corticale reflèterait, peut-être, une atteinte des circuits neuronaux qui contrecarre la récupération associée à la synchronie corticale. Nous allons discuter en détails l'implication de ces circuits dans les sections à venir.

Il est particulièrement intéressant de noter qu'une augmentation des activités thêta et delta, et une diminution de l'activité bêta sont fréquemment observées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et également chez des patients atteints de la maladie de Parkinson. Ceci peut refléter un dysfonctionnement des connexions corticales en lien avec une neurodégénérescence induite par ces maladies (Moretti et al., 2011; Yuvaraj et al., 2014; Brenner et al., 1986; Coben et al., 1983; Giaquinto and Nolfé, 1986). Il en va de même pour les patients avec le trouble d'hyperactivité et déficit de l'attention qui montrent une augmentation significative dans l'activité thêta (Hermens et al., 2005). Ce qui indique que des perturbations dans l'activité des ondes thêta sont associées à des déficits fonctionnels tels que le trouble de l'attention.

Outre nos observations spécifiques d'altération de la capacité à maintenir l'éveil après un TCL, nous avons également observé des changements dans l'activité delta pendant l'éveil. En effet, les souris TCL avaient une activité delta plus élevée pendant l'éveil que les souris Sham dans de la deuxième journée post-TCL. De manière similaire, une étude menée par Gosselin et al. (2009) ayant examiné la qualité du sommeil chez des patients TCL, a montré que les patients avec commotion cérébrale avaient une augmentation de l'activité delta pendant l'éveil et une diminution de l'activité alpha

comparés aux contrôles. Comme nous avons observé que cette différence dépend du temps du jour, il se peut que ces changements indiquent une perturbation de la rythmicité du cycle éveil/sommeil. En somme, selon la littérature animale et humaine ainsi que selon nos résultats, il semble que les TCL sont surtout associées à des problèmes de l'éveil, plutôt que des troubles du sommeil en soi.

4.2.3 Des plaintes de sommeil chez les patients trauma

L'observation d'un déficit dans l'éveil post-TCL peut contribuer à la compréhension de la physiopathologie de certains troubles de sommeil/éveil chez les patients TCL. Nous avons montré que le TCL affecte le maintien de longues périodes de l'éveil durant les premières 24h post-TCL. Comme les TCC sont très variables, les troubles de sommeil rapportés sont en conséquence assez variables d'une étude à l'autre. Contrairement à nos observations, Zeitzer et al. (2009) ont observé que l'insomnie survient chez environ 40% des patients TCL. Toutefois, plusieurs études ont effectivement rapporté que des troubles de l'éveil aussi et non seulement de sommeil apparaissent chez des patients TCC. Spécifiquement, une étude menée sur 96 patients dans les 4 premiers jours après TCC et à 6 mois plus tard a déterminé qu'à 6 mois post-traumatique, 28% avaient la somnolence diurne, et 5% ont eu l'insomnie (Baumann et al. 2007; Rao et al., 2008).

En général, le déficit dans le maintien de l'éveil et la réduction de la qualité de sommeil chez les patients sont probablement des manifestations qui reflètent des problèmes dans les circuits de maintien de l'éveil (Wiseman-Hakes et al., 2010 Ouellet et Morin, 2006). Pour bien comprendre les origines de ces troubles, nous allons discuter la physiopathologie des systèmes neuronaux impliqués dans la régulation du sommeil.

4.2.4 La neurophysiologie des circuits régulateurs du sommeil.

Physiologiquement, l'éveil est un ensemble de comportements multiples et cohérents qui permettent l'interaction avec le monde extérieur et qui se manifestent grâce à l'activation corticale. De plus, l'éveil est maintenu par un certain nombre de systèmes, comprenant l'activation de plusieurs neurotransmetteurs et circuits neuronaux dans différentes régions du cerveau. Parmi les principaux systèmes qui sont impliqués dans cet état, on cite les systèmes cholinergique, glutamatergique, dopaminergique et orexinegique; qui sont tous impliqués dans la promotion de l'éveil (Wright et al., 2012). La difficulté dans le maintien de l'éveil suite au TCL peut être le résultat d'altérations

dans l'un ou l'autre de ces systèmes. En effet, chaque système est distinct et a un rôle particulier dans le maintien de l'éveil (McCormick et Bal, 1997; Steriade, 1992; Alam et al., 1999; Strecker et al., 2000). De plus, des altérations des systèmes associés au sommeil pourraient aussi contribuer aux déficits de l'éveil. Par exemple, le système GABA connu pour favoriser le sommeil et ciblé pour traiter l'insomnie a été observé comme modifié immédiatement après le TCC. En effet, une étude menée chez des rats montre que l'expression de l'ARNm des sous-unités des récepteurs GABAA diminue 6h post-TCL (Drexel et al., 2015).

En plus de l'implication des neurones GABAergique, beaucoup d'études ont attribué un rôle puissant au système histaminergique dans la modulation et le maintien de l'éveil, surtout que la perte des neurones histaminergiques peut contribuer à une somnolence diurne excessive (Steininger et al., 1999; Takahashi et al., 2006). Chez les rongeurs, les neurones histaminergiques semblent jouer un rôle central dans le maintien de l'éveil, surtout que la synthèse de l'histamine, sa libération et sa dégradation sont régulées d'une façon circadienne, avec des niveaux plus élevés au cours de la période d'obscurité (où l'éveil est normalement un état dominant chez les rongeurs) et bas au cours de la période de lumière (Thakkar, 2011; Walker, 1968). De plus, le blocage pharmacologique de la synthèse de l'histamine chez les chats réduit l'éveil, mais inversement, l'augmentation de l'histamine endogène par le blocage pharmacologique de la dégradation de l'histamine favorise l'éveil (Lin et al., 1986). Dans le même contexte, un agoniste des voies histaminergiques pourrait favoriser l'éveil et neutraliser la somnolence diurne excessive associée à un certain nombre de troubles (Passani et Blandina, 2011; Castriotta et al., 2011). Peu d'études se sont intéressées à ces systèmes après les TCC. Récemment, une étude a démontré que le TCC sévère est associée à une perte nette de 41% des neurones histaminergiques (Valko et al., 2014), ce qui peut expliquer la difficulté de rester éveillé que nous rapportons dans notre étude. D'autre part, la même étude a rapporté que les neurones orexine ont diminué de 21% dans le hypothalamus des patients avec TCC sévère, ce qui concorde parfaitement avec une étude précédente ayant montré une diminution de 27% de ces mêmes neurones (Baumann et al., 2009). En conséquence, ces neurones sont impliqués dans la physiopathologie de la somnolence diurne (Valko et al., 2014).

4.2.5 Changements secondaires pouvant induire des changements neurophysiologiques :

Notre observation d'un déficit de l'éveil et d'augmentation de l'activité delta durant l'éveil est particulièrement intéressante puisqu'elle pourrait nous renseigner sur les origines de la somnolence diurne rapportée par les patients TCL. Autrement dit, il est possible que ce déficit de l'éveil génère dans le cerveau des changements, qui donnent en conséquence une nécessité et un besoin intense de dormir. La première interrogation que l'on pose suite à ces observations : quel est l'élément déclencheur d'un tel changement après le TCL. L'évaluation des mécanismes liés aux dommages secondaire post-TCL semble être une voie prometteuse pour essayer de comprendre ces changements. D'autre part, le fait que la somnolence persistait chez les patients TCL sous médication (modafinil) suggère que la somnolence diurne excessive est probablement causée, du moins en partie, par la réponse secondaire du cerveau et les mécanismes sous-jacents. De plus, ces événements représentent aussi un facteur nuisible à la plasticité synaptique (Hall et al., 2004, Opii et al., 2007). Il est donc attendu que la compréhension des changements de la réponse secondaire constituent une avenue intéressante pour comprendre l'origine des altérations de l'éveil et du sommeil, et contribueront à déterminer avec plus de précision les systèmes directement affectés.

4.3 Effet de la privation de sommeil après TCL

Les modèles animaux sont des outils puissants pour explorer la relation de cause à effet entre l'impact du traumatisme et ses conséquences sur la récupération, et éventuellement, pour contribuer à l'identification d'une cible thérapeutique et des biomarqueurs qui serviront au diagnostic.

4.3.1 La privation de sommeil affecte l'expression des gènes de plasticité dans le cortex

L'expression des gènes de plasticité que nous avons mesurés a été modifiée par la PS alors que le TCL n'a pas induit d'effets significatifs. En particulier, deux jours de PS

affectent l'expression de la plupart des gènes de plasticité dans le cortex cérébral, en diminuant l'expression de *Arc*, *Bdnf*, *Dnajb5*, *Fos*, *Homer1a* et *EphA4*, et en augmentant celle d'*EfnA3*. Dans l'hippocampe, la PS a diminué seulement l'expression d'*EfnB3*. En outre, dans l'hippocampe, nous avons observé des interactions significatives (TCL/PS) d'*Arc* et *EfnA3*, plus précisément, la PS diminue l'expression de ces gènes seulement chez les souris TCL (**Fig. 4** de l'article, voir chapitre 3).

La majorité des études montrent que l'expression des gènes de plasticité augmente pendant la privation de sommeil (Maret et al., 2007; Massart et al., 2014). En fait, l'expression des marqueurs de plasticité est généralement élevée pendant l'éveil et leur expression est généralement associée à la survie neuronale et à la neuroprotection (Acheson et al., 1995). La différence observée entre nos données et les études antérieures concernant l'expression des gènes de plasticité suite à une privation de sommeil semblent logique en raison de la particularité et la différence de la stratégie d'expérimentation dans chaque étude. La présente étude présente l'effet de deux jours de consécutifs de privation de sommeil sur l'expression des gènes qui a été mesurée plusieurs heures après. Ainsi, la diminution de l'expression de ces gènes après TCL pourrait nuire à la récupération. Par exemple, notre observation d'une diminution du *Bdnf* suite à la PS semble représenter un mauvais indicateur de la croissance neuronale post-TCL. Surtout que la réduction de *Bdnf* est en corrélation avec le déclin cognitif chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Peng et al., 2005). Aussi, ce gène a un rôle dans la croissance neuronale et dans la régénération axonale après le TCC (Yang et al., 1996; Griesbach et al., 2002; Hanell et al., 2012; Johnson et al., 2013). En effet, une augmentation de *Bdnf* suite au TCL contribuerait à une amélioration significative de la performance cognitive (Griesbach et al., 2004). De la même manière, la diminution de l'expression d'*Homer1a* peut nuire aux voies neuroprotectrices étant donné que l'expression d'*Homer1a* a été suggérée d'avoir un rôle neuroprotecteur après PS et après TCC par le blocage de récepteur de glutamate métabotrope du groupe 1/5 (mGluR1/5) (Maret et al., 2007; Luo et al., 2014).

Il est suggéré que l'induction des gènes de plasticité pendant l'éveil dépend de l'activité du système noradrénergique. Tononi et Cirelli (2000) ont trouvé que des lésions noradrénergiques sont associées à une diminution de ces gènes au cours de l'éveil, et que leur expression est semblable à leur niveau d'expression pendant le sommeil. Nos résultats montrent que la PS diminue l'expression d'*Arc* dans l'hippocampe uniquement

chez les souris TCL. Il est maintenant établi que *Arc* est requis à la plasticité (Guzowski et al., 2000) Des observations ont démontré que *Arc* est associés à des changements dans le cytosquelette d'actine (Dillon et Goda 2005), ceci a conduit à vouloir comprendre le rôle de *Arc* en plasticité synaptique. Dans les neurones de l'hippocampe, la surexpression de *Arc* augmente la densité des épines (spine density) in vitro, et la perturbation d'*Arc* diminue la densité de ces derniers in vivo (Peebles et al., 2010). Bien que ces effets fussent modestes, *Arc* a eu des effets impressionnants sur la morphologie des épines dans cette étude et il a spécifiquement augmenté la proportion des épines, que l'on appelle des épines de l'apprentissage qui sont plus plastique. Cela suggère qu'*Arc* est important pour former de nouveaux souvenirs ou d'oublier les anciens (Peebles et al., 2010). Cette implication d'*Arc* dans la plasticité suggère aussi que la PS peut être nuisible au fonctionnement neuronale particulièrement post-TCL. Dans les conditions physiologiques normales, les cellules progénitrices neurales se différencient et se développent ensuite en des neurones matures. Or, suite au TCC la différenciation est inhibée, et donne ainsi des neurones immatures qui ne se développent pas davantage (Yi et al., 2013; Gao et Chen 2013; Bye et al., 2011), ce qui représente un indice additionnel que la plasticité est fortement affectée. Ainsi, suite au TCC, le guidage axonal et la plasticité synaptique sont affectées. Cependant, une régulation positive de guidage axonal peut aboutir à des meilleurs résultats fonctionnels après le dommage (Schirmer et al., 2013; Frugier et al., 2012). La neurogènes a été suggéré comme clé pour la reprise et comme cible thérapeutique après TCC, et la lésion est souvent suivie par l'augmentation endogène des cellules progénitrices neuronales, la prolifération et la différenciation neuronale (Rice et al., 2003; Dash et al., 2001).

De manière intéressante, une étude a rapporté que la récupération post-TCC est meilleure chez les rats si elle se produit au cours de la phase d'obscurité du cycle diurne lorsque les rats sont dans la période de l'éveil (Martinez-Vargas et al., 2006). Également, des données du même groupe suggère que l'éveil est neuroprotecteur dans ce type de blessure, et que la PS post-TCC réduit les dommages morphologiques et améliore la récupération des rats (Martinez-Vargas et al., 2012). Ceci pourrait aussi appuyer le fait que nous n'avons pas eu une diminution majeure dans l'expression de ces gènes chez les animaux TCL.

Notre observation d'une diminution significative d'*EphA4* par la PS peut indiquer entre autres un effet positif de l'éveil après un TCL car son absence a été montrée comme

ayant un effet positif sur la régénération dans un modèle de trauma de la moëlle épinière (Spanevello et al., 2013). Par contre, une étude qui portait sur l'effet d'un KO conditionnel d'*EphA4* chez des souris soumises à un TCC en utilisant un modèle d'impact cortical contrôlé (CCI), n'avait montré aucun effet positif relié à cette mutation (Hanell et al., 2012). Cependant, les auteurs de cette étude rapportent que l'absence d'*EphA4* pourrait améliorer le pronostic après la lésion de la moelle épinière chez la souris. De plus, contrairement à notre observation, leur résultat montre une diminution d'*EphA4* chez les souris TCC comparé aux Sham uniquement dans l'hippocampe à 24h post-TCC. Leurs résultats s'opposent donc à un rôle bénéfique pour *EphA4* dans le processus de récupération après TCC, et les auteurs suggèrent qu'une inhibition pharmacologique de *EphA4* pourrait même être une avenue à considérer (Hanell et al., 2012).

Globalement, nos résultats montrent un effet important après deux jours de PS sur l'expression de gènes impliqués dans la plasticité et la neuroprotection, et que les gènes cibles sont affectés par la perte de sommeil au niveau du cortex plus que de l'hippocampe. Ces changements peuvent jouer un rôle important dans la progression de la lésion neuronale. Aussi, il apparaît probable que grâce à un effet neuroprotecteur de l'éveil post-TCL, l'expression de la majorité des gènes n'a pas été réduite après TCL.

4.3.2 La privation de sommeil affecte les gènes de l'horloge

Grâce aux analyses de séquençage, nous avons constaté des changements dans l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation des rythmes circadiens (*Bhlhe41*, *Nfil3*) après deux jours de PS. Des changements au niveau des gènes circadiens après TCC dans un modèle percussion de fluide latéral ont été observés dans une étude précédente (Boone et al., 2012). En effet, les auteurs montrent que chez les rats, les perturbations du rythme circadien après TCC sont médiées par des changements de l'expression des gènes de l'horloge (*Bmal1* et *Cry1*) mesurée par qPCR dans le noyau suprachiasmatique (NSC) et l'hippocampe. Aussi, une autre étude ayant examiné le lien entre TCC et des changements circadiens indique que les troubles du sommeil suivant TCC peuvent être dues à l'altération dans le rythme circadien (Orff et al., 2009). Ceci suggère qu'une lésion cérébrale engendre des perturbations du

rythme circadien qui pourraient être à la source des troubles de sommeil post-TCL. Nos travaux suggèrent que le manque de sommeil post-TCC pourrait exacerber cet effet.

4.3.3 TCL pourrait affecter l'homéostasie du calcium

Il faut garder en tête que la blessure du TCL induit des lésions qui peuvent mener à la formation d'une cicatrice gliale, la relâche des facteurs qui nuisent à la construction de myéline et aussi des inhibiteurs de guidage axonal, ce qui affecte le transcriptome. Nos résultats de RNA-seq montrent que le TCL diminue l'expression de *S100a8* qui code pour la protéine *S100a8* (aussi appelé calcium binding protein) de la famille S-100. Cette diminution de l'expression de *S100a8* semble indiquer des changements des niveaux de l'homéostasie du Ca^{2+} , sachant que S100A8 a un rôle important dans la régulation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire (Donato et al., 2013). Les changements de Ca^{2+} peuvent induire une série d'altérations physiologiques et aussi reprogrammer toute l'expression génique (Haasteren et al., 1999; Johnson et al., 1997). De plus, S100A8 a été impliquée dans la physiopathologie des troubles inflammatoires et tumoraux dans des études récentes (Xu et al., 2012; Ichikawa et al., 2011), et sa diminution favorise l'accélération des processus apoptotique (Yaundong et al., 2014). La diminution de *S100a8* que nous avons observé dans le cortex cérébral post-TCL s'oppose à d'autres observations qui montrent l'induction de S100A8 après ischémie et TCC (Engel et al., 2000; Postler et al., 1997). Il se pourrait ainsi que le TCL active spécifiquement des voies neuroprotectrices après la lésion vu que l'absence de *S100A8* a été associée à la neuroprotection (Ziegler et al., 2009).

4.3.4 Changement de l'expression des chimiokines et gènes gliaux après TCL

L'induction d'un TCC (soit léger ou sévère) par différents modèles (percussion fluide, impact cortical contrôlé) produit une réponse secondaire similaire à celle produite lors des TCC humains (Prins et al., 2013). Dans le présent travail, nous avons utilisé un modèle TCL sur crâne fermé (closed head injury) pour révéler les changements et la réponse secondaire associée à ce modèle. Ainsi, nous avons observé que des changements de l'éveil peuvent être originaires de la réponse secondaire post-TCL. Les processus pathologiques déclenchés au moment de l'impact se développent

probablement en parallèle aux troubles neurologiques, troubles du sommeil et troubles cognitifs (Castrionta et al., 2007). En outre, la libération secondaire des cytokines inflammatoires produites suivant le TCC suggère que le sommeil peut naturellement être induit après une lésion cérébrale, car l'augmentation de certaines cytokines a été impliquée dans l'induction accrue du sommeil (Dworak et al 2010; Chikahisa et Sei, 2011; Rowe et al., 2013; Ziebell et Kossmann, 2010). La sécrétion de médiateurs immunitaires peut être divisée en sous-groupes: les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF, IL-6), et les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, et TGF- β), et aussi les chimiokines, qui conduisent les cellules immunitaires périphériques dans la région lésée (Woodcock et Morganti-Kossmann., 2013). Aussi, après une lésion cérébrale, les niveaux des interleukines (IL-4, IL-5, IL-13) et le TNF- α ont augmenté chez le rat en phase aiguë et se restaurent à un niveau de base trois jours après la lésion (Dalgard et al.. 2012). Une augmentation des cytokines, avec les niveaux d'IL-1 β , IL-6 et TNF était également observée chez des patients TCC dans les trois premiers jours post-TCC (Helmy et al., 2011).

Aussi, il est possible que l'impact de l'activation de la microglie atteint les circuits de régulation de sommeil induisant une préférence pour le sommeil comparativement à l'éveil (Krueger, 2008; Cao et al., 2012; Jin et al., 2012). Contrairement à ce qui avait été rapporté dans ces études, nous n'avons pas trouvé de changement direct dans ces cytokines, mais nos résultats de séquençage de génome complet montrent que le TCL et la PS induisent l'expression des cytokines inflammatoire (IL-17A, IL4). L'activation de ces éléments a été associé a des perturbations de sommeil (Chirakalwasan et al., 2009).

Notre modèle expérimental de commotion cérébrale a montré pour la première fois que le TCL induit l'expression de deux chimiokines (*Ccl3* et *Cxcl5*) dans le cortex et dans l'hippocampe. Outre les chemokines, une autre molécule associée à la réponse immunitaire *Lgals3* a été augmentée chez les souris TCL dans le cortex, tandis que le niveau *S100a8* a été diminué. Cette réponse de microglie est cohérente avec les observations dans d'autres-modèles animaux de TCC (Chen et al., 2003; Kelley et al., 2006; Shitaka et al., 2011) et aussi avec observations chez des patients ayant subi un TCC (Johnson et al., 2013; Smith et al., 2013; Gentleman et al., 2004). Notre modèle supporte donc que la réponse neuro-inflammatoire persiste jusqu'à la 3e journée post-TCL (Dawes et al., 2011; Jeyaseelan et al., 2005; Zeng et al 2003), et qu'elle implique

l'activation de la microglie et des astrocytes. Nos résultats supportent ainsi également que l'activation de la microglie peut être une source potentielle de régulation du sommeil dans le cerveau lésé (Cao et al., 2012; Jin et al., 2012). À nouveau, l'ensemble de ces données suggèrent que le processus inflammatoire post-TCL implique des éléments qui peuvent agir dans la régulation de sommeil et dans l'activité EEG (Krueger et al., 1995; Krueger et al., 2001; Yasuda et al., 2005; Krueger 2008).

En générale, l'activation de la microglie peut être nuisible par l'activation de la voie classique neurotoxique, ou bénéfique par l'activation de la voie neuroprotectrice (Loane et Byrnes, 2010; Kossmann et al., 2002). Une activation persistante et progressive de la microglie au-delà de deux semaines peut transformer l'effet bénéfique de cette activation à un effet négatif (Hu et al., 2012). Dans le stade précoce de TCC, les processus engendrés par l'activation de la microglie éliminent les débris de neurones morts et protègent les neurones vulnérables en libérant des facteurs trophiques ou cytokines, et également favorisent la réparation des axones blessés (Horn et al., 2008; Neumann et al., 2009). Mais dans certains cas, l'activation de la microglie après TCC persiste pendant des mois, voire des années où elle devient chronique (Gentleman et al., 2004 et Johnson et al., 2013). Bien que le lien entre la neuro-inflammation chronique et l'activation de la microglie dans les TCC n'est pas tout à fait clair, dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la microglie peut induire la dégénérescence (Akiyama et al., 2000; Liao et al., 2012). En outre, la suppression de l'activation de la microglie par la minocycline a montré des effets favorables chez les animaux TCC (Siopi et al., 2011; 2012). Les deux effets favorable et défavorable sont souvent rapportés, ce qui rend la compréhension du rôle précis de ces voies un peu difficile (McPhail et al., 2004; Prewitt et al., 1997; Donnelly et Popovich, 2008).

Il est possible que le déficit dans les longues périodes d'éveil chez les souris TCL puisse résulter de la réponse inflammatoire. En revanche, d'autres processus peuvent être directement altérés suite à l'activation de la microglie comme la mémoire, étant donné que la difficulté de reconnaissance des objets a été associée à une activation de la microglie (Shetty et al., 2014). Néanmoins, il est actuellement difficile de savoir si ces changements de la microglie persistent à long terme, et s'ils déclenchent d'autres changements (tels que des modifications dans la structure et la fonction des neurones et des synapses, et la dégénérescence axonale), qui contribueront à l'apparition des séquelles post-TCL telles que les troubles de l'attention et de la cognition. Il a été

démontré que l'activation de la microglie persiste jusqu'à sept jours post-TCC (Ziebell et al. 2012). Aussi, le rôle de la microglie dans la régénération axonale est assez complexe, et les études centrées sur l'activation de la microglie et sur son implication aux conséquences du TCL sont à leur début. D'autres études seront donc nécessaires pour examiner la relation entre l'activation de la microglie et les troubles de sommeil post-TCL que ce soit chez l'animal ou chez l'humain.

D'autre part, nous avons observé une importante augmentation dans le marqueur astrocytaire *Gfap* après TCL à la fois dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe. Ceci est similaire à d'autres observations d'une augmentation protéique du GFAP une semaine suite à une lésion cérébrale chez les souris (Hazra et al., 2014). Il est établi que les cellules gliales ont un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie des synapses, avec un rôle fondamental dans l'approvisionnement en énergie (Hassel et al., 1995; Westergaard et al., 1995; Allaman et al., 2011) et dans la clairance du glutamate (Hansson et al., 1985; Bergles et al., 1997; Coulter et Eid, 2012; Nagelhus et Ottersen, 2013). Outre ces fonctions homéostatiques, les astrocytes modulent la dynamique de l'activité neuronale (Wang et al., 2012). Des études ont montré que les astrocytes peuvent induire des changements fonctionnels et morphologiques dans les synapses par l'absorption ou la libération de glio-transmetteurs, tels que le glutamate et l'ATP (Santello et al., 2012; Agulhon et al., 2008; Hamilton et Attwell, 2010; Araque et al., 2014). Contrairement aux neurones, les astrocytes ne possèdent pas de l'excitabilité électrique, ils sont tout de même en mesure de répondre à différents neurotransmetteurs via une signalisation des ions Ca^{2+} . Spécifiquement les astrocytes ont des récepteurs d'acétylcholine et d'histamine couplé aux Ca^{2+} (Duffy et MacVicar, 1995; Shelton et McCarthy, 2000; Araque et al., 2002, 2014). En effet, les astrocytes sont capables de détecter l'activité synaptique dans des différentes régions induites par plusieurs neurotransmetteurs, tels que le glutamate, le GABA, de l'acétylcholine, de l'ATP (Zorec et al., 2012). De plus, les astrocytes ont un rôle actif et crucial sur le fonctionnement du système cholinergique (Takata et al., 2011; Navarrete et al., 2012). Dans le cortex visuel, l'activation cholinergique des astrocytes stimule la libération de glutamate, qui, en association avec d'autres stimuli, module des changements de plasticité à long terme (Takata et al., 2011; Chen et al., 2012). Ces mêmes systèmes qui sont modulés par les astrocytes sont aussi impliqués dans la neurophysiologie de sommeil, suggérant un rôle important des astrocytes dans la régulation du sommeil (Xie et al., 2013). Bien que le

système cholinergique module l'état de l'éveil, il faut encore plus de données sur la signification physiologique de l'induction cholinergique du Ca^{2+} astrocytaire pour la régulation du sommeil (Navarrete et al., 2012). En somme, les changements des marqueurs astrocytaire post-TCL contribuent probablement aux troubles de sommeil suite au TCL en modulant les circuits neuronaux qui régulent la synchronisation corticale.

4.4 Limites de l'étude et perspectives

4.4.1 Limite de l'étude

L'utilisation des modèles animaux est d'une nécessité primordiale pour comprendre les aspects moléculaires qui sous-tendent les conséquences du TCC en clinique. Cependant, les anesthésiques et les analgésiques sont régulièrement administrés au cours des interventions chirurgicales pour réduire la douleur, l'inconfort et aussi pour assurer l'immobilisation. Toutefois, les anesthésiques utilisés pour l'induction de TCC expérimental peuvent interférer avec les résultats, car les anesthésiques peuvent moduler le degré de neuroprotection. Ceci suggère que le choix des anesthésiques utilisés dans les modèles de TCC peut modifier le résultat des blessures et être en partie responsable de la variabilité observée dans quelques études (Statler et al., 2006). Par exemple, l'isoflurane est un anesthésique par inhalation couramment utilisé qui semble protéger contre les dommages fonctionnels par rapport à d'autres anesthésiques, en modulant l'excitotoxicité ou par l'augmentation de flux sanguin cérébral (Statler et al., 2000). Statler et al., (2006) ont évalué l'effet de l'isoflurane au moment de la chirurgie TCC. Les rats ont reçu l'isoflurane ou le fentanyl ou aucune anesthésie, et ils ont observé que l'isoflurane atténue le dommage hippocampique. Plus spécifiquement, dans la région CA1 de l'hippocampe, l'isoflurane en comparaison au fentanyl induit une neuroprotection contre la mort cellulaire, et aussi améliore la survie des neurones de la région CA3 (Statler et al., 2000; 2006). Il est possible que l'isoflurane peut même atténuer la réponse des marqueurs de plasticité, sachant qu'il module l'excitotoxicité en réduisant la libération de glutamate (Patel et al., 1995) ainsi qu'en bloquant les récepteurs NMDA (Bickler et al., 1994). Ainsi, il est possible que l'effet neuroprotecteur de l'isoflurane ait affecté nos résultats, en induisant ainsi une atténuation des effets de TCL sur l'expression des gènes de plasticité.

Un autre anesthésique que nous avons utilisé pour nos chirurgies d'implantation d'électrodes est la Kétamine. Cet anesthésique présente aussi des propriétés neuroprotectrices après TCC dû à son rôle d'antagoniste des récepteurs NMDA (McIntosh et al., 1990; Jevtovic-Todorovic et al., 1998; Kawaguchi et al., 2005; Smith et al., 1993). En effet, l'administration de Kétamine à des rats TCC (percussion de fluide) induit des changements dans la réponse inflammatoire (Ward et al., 2011; Corlett et al., 2013). De plus, la Kétamine peut changer la nature d'une lésion cérébrale par des mécanismes impliquant l'inhibition de l'inflammation (Ward et al., 2011, Chang et al., 2013). Probablement que dans notre modèle, l'effet neuroprotecteur de la Kétamine a masqué l'impact réel du TCL sur l'architecture de sommeil dans les premières 24h post-TCL.

Nous pensons aussi que l'effet de chirurgie peut affecter nos résultats, nous n'avons pas pu toutefois mener la chirurgie d'implantation avant la chirurgie TCL vue que la zone d'impact ne pourrait pas être accessible dans ce cas. La chirurgie d'implantation est une chirurgie qui exige normalement une récupération de quelques jours. Or, pour la réalisation de notre étude qui avait pour but de déceler l'effet immédiat du TCL sur l'architecture de sommeil, il n'était pas possible de laisser aux souris plus que 14h de récupération. En conséquence, dans notre modèle, l'enregistrement de sommeil des toutes premières heures post-TCL n'a pas été effectué pour laisser les animaux récupérer les premières 14h. Des changements importants survenant immédiatement après le TCL n'ont ainsi pas pu être détectés.

Nos résultats de sommeil présentent également une grande variabilité. Il se peut que le nombre de sujets dans chaque groupe à l'étude n'ait pas été suffisant. C'est pourquoi nous avons reproduit récemment la même expérience d'enregistrement de sommeil d'un nouveau groupe de souris TCL/Sham. Ceci permettra d'étayer davantage nos observations sur l'évolution de l'EEG. Cependant, la contrainte qui est inhérente à la recherche sur les TCC est la grande variabilité qui les caractérise que ce soit chez l'humain ou dans les modèles animaux. Malgré ceci, nous pensons que notre modèle s'est révélé approprié pour étudier le sommeil suite aux TCL.

4.4.2 Perspectives à venir

Il est clair que des modifications sont présentes aux niveaux des circuits corticaux suite à l'impact du TCL, ce qui pourrait affecter la récupération. En particulier, il est possible qu'en fonction de la lésion, les voies qui sont activées puissent être en rapport avec l'amélioration ou non de la récupération et avec l'apparition des séquelles plus tard. La recherche sur la plasticité neuronale est ainsi une voie prometteuse pour investiguer et traiter les TCC. Pourtant, cette voie est encore à ses débuts, et il est incertain si cela permettrait d'améliorer la pratique clinique, et si ceci pourrait être un moyen de restaurer les fonctions altérées.

La majorité des études se sont concentrées sur les conséquences et séquelles du TCL qui apparaissent plus tard. Or, l'élément clé pour résoudre un problème est d'étudier la cause Initiale. Dans ce sens, d'autres études sont ultimement nécessaires, et il faut donc encourager la recherche qui vise à déceler les changements immédiats qui se produisent suite au TCL. Ceci facilitera la prévention et l'initiation appropriée du traitement, et également permettra d'enrichir la recherche pour aboutir à des conclusions fiables et des interprétations plus précises.

Dans ce contexte, l'étape suivante du présent travail consiste à analyser le sommeil des 4 autres jours suivants que nous avons enregistrés. Aussi il serait très intéressant d'analyser les résultats de la récupération suite à la PS qui a été effectuée le cinquième jour après la chirurgie. Ainsi, ceci permettra de voir les résultats de l'analyse complète de la progression de l'EEG pendant 6 jours après TCL et surtout comment le TCL affecte la récupération. De plus, ces résultats futurs seront moins affectés par l'effet des chirurgies qui a certainement nuancé nos observations durant les deux premières journées.

4.5 Conclusion

Les résultats du travail de maîtrise présentés dans ce mémoire et dans notre article répondent aux hypothèses émises dans l'introduction. Ils révèlent un déficit dans le maintien de l'éveil suite à un TCL chez la souris. Ce déficit semble impliquer plusieurs changements dans l'activité EEG. Ces observations ont été effectuées parallèle de celles de changements moléculaires après une privation de sommeil post-TCL, au niveau des marqueurs de plasticité, de l'inflammation et des gènes impliqués dans les

rythmes circadiens. Nous pensons que ces observations sont nouvelles et importantes et qu'elles ouvrent des voies pour les prochaines études. En conclusion, nos données appuient le fait que l'éveil est altéré les premiers jours post-TCL, et aussi que le manque de l'éveil suite au TCL modifie la capacité de récupération. Dans le futur, il sera pertinent d'étudier les mécanismes précis impliqués dans la régulation, le maintien et la consolidation de l'éveil suite au TCL, pour permettre une identification précise de l'origine de ces perturbations.

•

Références

- Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M., 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374(6521):450-3.
- Ackermann, K., Victoria, L., Revell, Oscar Lao, Elwin J. Rombouts, Debra J. Skene, Manfred Kayser Sleep. 2012 July 1; 35(7): 933–940.
- Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 59(6):932-46.
- Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932–946
- Alam, M.N., Szymusiak, R., Gong, H., King, J., McGinty, D., 1999. Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J. Physiol.* 521, 679–690.
- Alhaider, I.A., Aleisa, A.M., Tran, T.T., Alzoubi, K.H., Alkadhi, K.A., 2010. Chronic caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity. *Sleep* 33: 437–444.
- Allaman, I., Bélanger, M., Magistretti, P.J., 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 34, 76–87.
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., Ikeda, K., 2000. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14(1):S47-53
- Antal, A., and Paulus, W., 2010. Effects of transcranial theta-burst stimulation on acute pain perception *Restorative Neurology and Neuroscience* 477–484.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., Volterra, A., 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., Volterra, A., 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 81(4):728-39.
- Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., Buño, W., 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22, 2443–2450.
- Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., Buño, W., 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22(7):2443-50.
- Aricò D, Drago V, Foster PS, Heilman KM, Williamson J, Ferri R. Effects of NREM sleep instability on cognitive processing. *Sleep Med* 2010;11:791-8.
- Aschoff, J., 1965. Response curves in circadian periodicity. ed., *Circadian clocks:* Amsterdam, North Holland Publishing Co. 95-111.

- Aton, S.J., Seibt, J., Dumoulin, M., Jha, S.K., Steinmetz, N., Coleman, T., Naidoo, N., Frank, M.G., 2009.** Mechanisms of sleep-dependent consolidation of cortical plasticity. *Neuron*.12;61(3):454-66.
- Baumann, C.R., 2012.** Traumatic brain injury and disturbed sleep and wakefulness. *Neuromolecular Med* 14(3):205-12.
- Baumann, C.R., Werth, E., Stocker, R., Ludwig, S., Bassetti, C.L., 2007.** Sleep-wake disturbances 6 months after traumatic brain injury: a prospective study. *Brain* 130 (Pt 7):1873-83.
- Baumann, C.R., 2012.** Traumatic brain injury and disturbed sleep and wakefulness. *Neuromolecular medicine. Neuromolecular Med.* 14(3):205-12.
- Baumann, C.R., Werth, E., Stocker, R., Ludwig, S., Bassetti, C., 2007.** Sleep-wake disturbances 6 months after traumatic brain injury: a prospective study. *Brain*;130:1873-83.
- Bagnato, S., Minafra, L., Bravatà, V., Boccagni, C., Sant'angelo, A., Castiglione, A., Andriolo, M., Lucca, L.F., De Tanti, A., Pistarini, C., Formisano, R., Dolce, G., Gelfi, C., Galardi, G., 2012.** Brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) polymorphism does not influence recovery from a post-traumatic vegetative state: a blinded retrospective multi-centric study. *J Neurotrauma.* 29(11):2050-9
- Bazarian, J.J., Wong, T., Harris, M., Leahey, N., Mookerjee, S., Dombovy, M., (1999).** Epidemiology and predictors of post-concussive syndrome after minor head injury in an emergency population. *Brain Inj.* 13, 173–18910.
- Bauer, J., Sminia, T., Wouterlood, F.G., Dijkstra, C.D., 1994.** Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 38(4):365-75.
- Bazarian, J.J., McClung, J., Shah, M.N., Cheng, Y.T., Flesher, W., Kraus, J., 2005.** Mild traumatic brain injury in the United States, *Brain Inj.* 19(2):85-91.
- Belenky, G., Wesensten, N.J., Thorne, D.R., Thomas, M.L., Sing, H.C., Redmond, D.P., Russo, M.B., Balkin, T.J., 2003.** Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleepdose-response study. *J Sleep Res.* 12(1):1-12.
- Bergles, D.E., Dzubay, J.A., Jahr, C.E., 1997.** Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 14821–14825.
- Bickler, P.E., Buck, L.T., Hansen, B.M., 1994.** Effects of isoflurane and hypothermia on glutamate receptor-mediated calcium influx in brain slices. *Anesthesiology* 81:1461-1469
- Blomgren, K., Hagberg, H., 2006.** Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 40:388 –397.

- Bloomfield, I.L., Espie, C.A., Evans, J.J., 2010.** Do sleep difficulties exacerbate deficits in sustained attention following traumatic brain injury? *Journal of the International Neuropsychological Society*, 16(1), 17–25.
- Bolton, M.M., Pittman, A.J., Lo, D.C., 2000.** Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J Neurosci* 1;20(9):3221-32
- Borbély, A.A., 1982.** A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol.* 1(3):195-204.
- Boone. D.R., Sell, S.L., Micci, M.A., Crookshanks, J.M., Parsley, M., 2012.** Traumatic Brain Injury-Induced Dysregulation of the Circadian Clock. *PLoS ONE* 7(10).
- Brenner, R.P., Ulrich, R.F., Spiker, D.G., Scwabassi, R.J., Reynolds III, C.F., Marin, R.S., et al. 1986.** Computerized EEG spectral analysis in elderly normal, demented and depressed subjects. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 64, 483–492.
- Brough, D., Tyrrell, P.J., Allan, S.M., 2011.** Regulation of interleukin-1 in acute brain injury. *Trends Pharmacol Sci.* ;32(10):617-22.
- Brown, R.E., Basheer, R., McKenna, J.T., Strecker, R.E., McCarley, R.W., 2012.** Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev* 92(3):1087-187.
- Burnstock, G., 2007.** Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 87(2):659-797.
- Bye, N., Carron, S., Han, X., Agyapomaa, D., Ng, S.Y., Yan, E., Rosenfeld, J.V., Morganti-Kossmann, M.C., 2011.** Neurogenesis and glial proliferation are stimulated following diffuse traumatic brain injury in adult rats. *J Neurosci Res* 89(7):986-1000
- Chamoun, R., Suki, D., Gopinath, S.P., Goodman, J.C., Robertson, C., 2010.** Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg* 113(3):564-70
- Cantu, D., Walker, K., Taylor-Weiner, L.A., Hampton, D., Tesco, G., Dulla, C.G., 2014.** Traumatic Brain Injury Increases Cortical Glutamate Network Activity by Compromising GABAergic Control Cereb. *Cortex*
- Cao, M., Guilleminault, C., 2012.** Acute and chronic sleep loss: implications on age-related neurocognitive impairment. *Sleep* 35(7):901-2
- Charisse, N., Winston, Deepa Chellappa, Tiffany Wilkins, David J. Barton, Patricia M. Washington., David J. Loane., David N. Zapple., and Mark P. Burns., 2013.** Controlled Cortical Impact Results in an Extensive Loss of Dendritic Spines that Is Not Mediated by Injury-Induced Amyloid-Beta Accumulation. *Journal of Neurotrauma* 30:1966–1972
- Cavadini, G., Petrzilka, S., Kohler, P., Jud, C., Tobler, I., Birchler, T. et al. (2007).** TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 104, 12843-12848.
- Castriotta, R.J., Wilde, M.C., Lai, J.M., Atanasov, S., Masel, B.E., Kuna, S.T. 2007.** Prevalence and consequences of sleep disorders in traumatic brain injury. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 3(4), 349–356.

- Castriotta, R.J., Wilde, M.C., Lai, J.M., Atanasov, S., Masel, B.E., & Kuna, S.T., 2007.** Prevalence and consequences of sleep disorders in traumatic brain injury. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 3(4), 349–356.
- Che, X., Ye, W., Panga, L., Wu, D.C., Yang, G.Y., 2001.** Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res* 902(2):171-7.
- Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., 1999.** Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98(4), 437-451.
- Chen, L., Thakkar, M.M., Winston, S., Bolortuya, Y., Basheer, R., McCarley, R.W., 2006.** REM sleep changes in rats induced by siRNA-mediated orexin knockdown. *Eur J Neurosci* 24(7):2039-48.
- Chikahisa, S., Sei, H., 2011.** The role of ATP in sleep regulation. *Frontiers in neurology* 2:87
- Ziebell, J.M., Morganti-Kossmann, M.C., 2010.** Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7:22-30.
- Chirakalwasan, N., Hassan, F., Kaplish, N., Fetterolf, J., Chervin, R.D., 2009.** Near resolution of sleep related rhythmic movement disorder after CPAP for OSA. *Sleep Med* 10(4):497-500.
- Christman, C.W., Salvant, J.B., Jr, Walker, S.A., Povlishock, J.T., 1997.** Characterization of a prolonged regenerative attempt by diffusely injured axons following traumatic brain injury in adult cat: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* 94(4):329-37.
- Cirelli, C., Tononi, G., 2000.** Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J Neurosci.* 15;20(24):9187-94.
- Coben, L.A., Danziger, W.L., and Berg, L., 1983.** Frequency analysis of the resting awake EEG in mild senile dementia of Alzheimer type. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 55, 372–380.
- Coenen, AM., 1995.** Neuronal activities underlying the electroencephalogram and evoked potentials of sleeping and waking: implications for information processing. *Neurosci Biobehav Rev.* 447-63.
- Cohen, M., Oksenberg, A., Snir, D., Stern, M.J., Groswasser, Z., 1992.** Temporally related changes of sleep complaints in traumatic brain injured patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:313-315.
- Cole JT, Mitala CM, Kundu S, et al.** Dietary branched chain amino acids ameliorate injury-induced cognitive impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(1):366-371.
- Colicos, M.A., Dixon, C.E., Dash, P.K., 1996.** Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain Res.* 739(1-2):111-9.

- Coulter, D.A., Eid, T., 2012. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60, 1215–1226.
- Curie T., Mongrain, V., Dorsaz, S., Mang, G.M., Emmenegger, Y., Franken, P., 2013. Homeostatic and circadian contribution to EEG and molecular state variables of sleep regulation. *Sleep* 1;36(3):311-23.
- Curie, T., Maret, S., Emmenegger, Y., Franken, P., 2015. In Vivo Imaging of the Central and Peripheral Effects of Sleep Deprivation and Suprachiasmatic Nuclei Lesion on PERIOD-2 Protein in Mice. *Sleep* 00638-14.
- Daan, S., Beersma, D.G, Borbély, A.A., 1984. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol.* 161-83.
- Dalgard, C.L., Cole, J.T., Kean, W.S., Lucky, J.J., Sukumar, G., McMullen, D.C., Pollard, H.B., Watson, W.D., 2012. The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. *Front Mol Neurosci* 25;5:6.
- Dash, P.K., Mach, S.A., Moore, A.N., 2001. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 15;63(4):313-9.
- Degos, V., Teissier, N., Gressens, P., Puybasset, L., Mantz, J., 2008. Inflammation and acute brain injuries in intensive care. *Ann Fr Anesth Reanim* 27(12):1008-15.
- Diaz-Arrastia, R., Kochanek, P.M., Bergold, P., Kenney, K., Marx, C.E., Grimes, C.J., Loh, L.T., Adam, L.T., Oskvig, D., Curley, K.C., 2014. Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup. *J Neurotrauma* 31(2):135-58
- Diekelmann, S., Born, J., 2010. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11(2):114-126
- Dikmen, S.S., Corrigan, J.D., Levin, H.S., Machamer, J., Stiers, W., Weisskopf, M.G., 2009. Cognitive outcome following traumatic brain injury.. *J Head Trauma Rehabil* 24(6):430-8.
- Dinges, D.F., Pack, F., Williams, K., Gillen, K.A., Powell, K.W., Ott, G.E., Aptowicz, C., Pack, A.I., 1997. Cumulative sleepiness, mood disturbance, and psychomotor performance decrements during a week of sleep restricted to 4–5 hours per night. *Sleep* 20: 267–283.
- Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., Geczy, C.L., 2013. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 13(1):24-57.
- Donnelly, D.J., Popovich, P.G., 2008. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209(2):378-8
- Duclos, C., Dumont, M., Blais, H., Paquet, J., Laflamme, E., de Beaumont L., Wiseman-Hakes, C., Menon, D.K., Bernard, F., Gosselin, N., 2013. Rest-Activity Cycle Disturbances in the Acute Phase of Moderate to Severe Traumatic Brain Injur. *Neurorehabil Neural Repair.* 28(5):472-482.

- Duclos, C., Dumont, M., Wiseman-Hakes, C., Arbour, C., Mongrain, V., Gaudreault, P.O., Khoury, S., Lavigne, G., Desautels, A., Gosselin, N., 2014. Sleep and wake disturbances following traumatic brain injury. *Pathol Biol (Paris)*. 62(5):252-61.
- Drummond, S.P., Gillin, J.C., Brown G.G., 2001. Increased cerebral response during a divided attention task following sleep deprivation. *J Sleep Res* 10(2):85-92.
- Drexel, M., Puhakka, N., Kirchmair, E., Hörtnagl, H., Pitkänen, A., Sperka, G., 2015. Expression of GABA receptor subunits in the hippocampus and thalamus after experimental traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 88: 122–133.
- Duffau, H., Capelle, L., 2001. Functional recuperation following lesions of the primary somatosensory fields. Study of compensatory mechanisms]. *Neurochirurgie* 47(6):557-63.
- Duffy, S., MacVicar, B.A., 1995. Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J. Neurosci.* 15, 5535–5550.
- Duffy, S., MacVicar, B.A., 1995. Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J Neurosci* 15(8):5535-50
- Dworak, M., McCarley, R.W., Kim, T., Kalinchuk, A.V., Basheer, R., 2010. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J Neurosci* 30(26):9007-16.
- Dworak, M., McCarley, R.W., Kim, T., Kalinchuk, A.V., 2010. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep, *Basheer RJ Neurosci.*30(26):9007-16.
- Dworak, M., McCarley, R.W., Kim, T., Kalinchuk, A.V., Basheer, R., 2010. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30:9007-9016.
- El Helou, J., Bélanger-Nelson, E., Freyburger, M., Dorsaz, S., Curie, T., La Spada, F., Gaudreault, P.O., Beaumont, É., Pouliot, P., Lesage, F., Frank, M.G., Franken, P., Mongrain, V., 2013. Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;110 (24):9974-9.
- Engel, S., Schluesener, H., Mittelbronn, M., Seid, K., Adjodah, D., Wehner, H.D., Meyermann, R., 2000. Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol* 100(3):313-22.
- Englander, J., Hall, K., Stimpson, T., Chaffin, S., 1992. Mild traumatic brain injury in an insured population: subjective complaints and return to employment.. *Brain Inj.* 6(2):161-6.
- Falkenberg, C., Bjorck, L., and kerstrom, B., 1992. *Biochemistry*, 31, 1451–1457.
- Ferriero, D.M., 2004. Neonatal brain injury *N Engl J Med.* 351(19):1985-9.
- Folkersma, H., Dingley, J.F., Van Berckel, N.M., Rozemuller, A., Boellaard, R., Reimund, E., 1994. The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses.* Oct;43(4):231-3.
- Frank, M.G., Heller, H.C., 1997. Development of REM and slow wave sleep in the rat. *Am J Physiol.* 272:1792–1799.

- Frank, M.G., 2006. The mystery of sleep function: current perspectives and future directions. *Rev Neurosci.* 17(4):375-92.
- Franken, P., Tobler, I., Borbély, A.A., 1991. Sleep homeostasis in the rat: simulation of the time course of EEG slow-wave activity. *Neurosci Lett.* 141-4.
- Franken, P., 2007. The quality of waking and process S. *Sleep* 30(2):126-7
- Frugier, T., Conquest, A., McLean, C., Currie, P., Moses, D., Goldshmit, Y., 2012. Expression and activation of EphA4 in the human brain after traumatic injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(3):242-50
- Fox, G.B., Fan, L., Levasseur, R.A., and Faden, A.I. 1998. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse. *J. Neurotrauma* 15, 599–614.
- Fung C, Nguyen M, Wiseman-Hakes C, Colantonio A. 2011. Preliminary validation of a new instrument for monitoring sleep, wakefulness and daytime function: Daily cognitive-communication and sleep profile. *Sleep Medicine.* ;12(Suppl 1):S127.
- Gale, S.D., Baxter, L., Roundy, N., Johnson, S.C., 2005. Traumatic brain injury and grey matter concentration: a preliminary voxel based morphometry study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(7):984-8.
- Gao, X., Chen, J., 2013. Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Exp Neurol* 239:38-48.
- Gao, X., Chen, J., 2011. Mild traumatic brain injury results in extensive neuronal degeneration in the cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(3):183-191.
- Gentleman, S.M., Leclercq, P.D., Moyes, L., Graham, D.I., Smith, C., Griffin, W.S., Nicoll, J.A., 2004. Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *Forensic Sci Int* 146(2-3):97-104.
- Gevins, A., Smith, M.E., McEvoy, L., Yu, D., 1997. High-resolution EEG mapping of cortical activation related to working memory: effects of task difficulty, type of processing, and practice *Cereb Cortex.* 7(4):374-85.
- Giaquinto, S., and Nofre, G. 1986. The EEG in the normal elderly: a contribution to the interpretation of aging and dementia. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 63, 540–546.
- Giza, C.C., Maria, N.S., Hovda, D.A., 2006. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J Neurotrauma* 23(6):950-61.
- Giza, C.C., Prins, M.L., Hovda, D.A., Herschman, H.R., Feldman, J.D., 2002. Genes preferentially induced by depolarization after concussive brain injury: effects of age and injury severity. *J Neurotrauma* 19(4):387-402.
- Griesbach, G.S., Gomez-Pinilla, F., Hovda, D.A., 2004. The upregulation of plasticity-related proteins following TBI is disrupted with acute voluntary exercise. *Brain Res* 1016(2):154-62.

- Griesbach, G.S., Hovda, D.A., Molteni, R., Gomez-Pinilla, F., 2002. Alterations in BDNF and synapsin I within the occipital cortex and hippocampus after mild traumatic brain injury in the developing rat: reflections of injury-induced neuroplasticity. *J Neurotrauma* 19(7):803-14.
- GuzmanMarin, R., Ying, Z., Suntsova, N., Methippara, M., Bashir, T., Szymusiak, R., Gomez-Pinilla, F., McGinty, D., 2006. Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J Physiol* 575: 807–819.
- Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., McGaugh, J.L., Worley, P.F., Barnes, C.A., 2000. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20: 3993–4001.
- Hairston, I.S., Peyron, C., Denning, D.P., Ruby, N.F., Flores, J., Sapolsky, R.M., Heller, H.C., O'Hara, B., 2004. Sleep deprivation effects on growth factor expression in neonatal rats: a potential role for BDNF in the mediation of delta power. *F. J Neurophysiol.* 91(4):1586-95.
- Hall, B.J., Chebib, M., Hanrahan, J.R., Johnston, G.A., 2004. Flumazenil-independent positive modulation of gamma-aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant alpha1beta2gamma2L and alpha1beta2 GABAA receptors. *Eur J Pharmacol* 26;491(1):1-8.
- Hamilton, N.B., Attwell, D., 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238.
- Hamilton, N.B., Attwell, D., 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11(4):227-38.
- Hansson, E., Eriksson, P., Nilsson, M., 1985. Amino acid and monoamine transport in primary astroglial cultures from defined brain regions. *Neurochem. Res.* 10, 1335–1341
- Hånell, A., Clausen, F., Djupsjö, A., Vallstedt, A., Patra, K., Israelsson, C., Larhammar, M., Björk, M., Paixão, S., Kullander, K., Marklund, N., 2012. Functional and histological outcome after focal traumatic brain injury is not improved in conditional EphA4 knockout mice. *J Neurotrauma* 29(17):2660-71
- Harano, T., Miyatake, T., 2010. Genetic basis of incidence and period length of circadian rhythm for locomotor activity in populations of a seed beetle. *Heredity (Edinb).* 268-73
- Hairston IS, Peyron C, Denning DP, Ruby NF, Flores J, Sapolsky RM, Heller HC, O'Hara BF. Sleep deprivation effects on growth factor expression in neonatal rats: a potential role for BDNF in the mediation of delta power. *J Neurophysiol.* 2004;91:1586–1595.
- Hassel, B., Westergaard, N., Schousboe, A., Fonnum, F., 1995. Metabolic differences between primary cultures of astrocytes and neurons from cerebellum and cerebral cortex. Effects of fluorocitrate. *Neurochem. Res.* 20, 413–420.
- He, Y., Zhou, A., Jiang, W., 2013. Toll-like receptor 4-mediated signaling participates in apoptosis of hippocampal neurons. *Neural Regen Res* 8(29):2744-53
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., and Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* 12, 656–670.

- Helmy, A., Carpenter, K.L., Menon, D.K., Pickard, J.D., Hutchinson, P.J., 2011.** The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31(2):658-70.
- Hermens, D.F., Soei, E.X., Clarke, S.D., Kohn, M.R., Gordon, E., Williams, L.M., 2005.** Resting EEG theta activity predicts cognitive performance in attention-deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Neurol* 32:24–56.
- Hertz, L., Zielke, H.R., 2004.** Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 27(12):735-43.
- Hobson, J.A., Edward, F., Schott, P., 2002.** The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nature Reviews Neuroscience.* 3, 679-693
- Honda, M., Tsuruta, R., Kaneko, T., Kasaoka, S., Yagi, T., Todani, M., Fujita, M., Izumi, T., Maekawa, T., 2010.** Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma* 69(1):104-9.
- Horne, J.A., 1988.** Sleep loss and "divergent" thinking ability. *Sleep.* 11(6):528-36.
- Horne, J.A., 1993.** Human sleep, sleep loss and behaviour. Implications for the prefrontal cortex and psychiatric disorder. *Br J Psychiatry.* 162:413-9.
- Hicks R.R., Smith D.H., Lowenstein D.H., Saint Marie R, and Mcintosh T.K.** *Journal of Neurotrauma.* WINTER 1993, 10(4): 405-414. doi:10.1089/neu.1993.10.405.
- Horn, K.P., Busch, S.A., Hawthorne, A.L., van Rooijen, N., Silver, J., 2008.** Another barrier to regeneration in the CNS: Activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J Neurosci* 28:9330–9341.
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R.K., Chen, S., Gao, Y., Chen, J., 2012** Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43(11):3063-70.
- Hublin, C., Partinen, M., Koskenvuo, M., Kaprio, J., 2007.** Sleep and mortality: a population-based 22-year follow-up study. *Sleep.* 30:1245–1253.
- Hur, Y.M., Bouchard, T.J., Lykken, D.T., 1998.** Genetic and environmental influences on morningness– eveningness. *Personality and Individual Differences.* 917–925.
- Huisman M.C., Lammertsma, A.A., Vandertop W.P., Molthoff, F.M., 2011.** Increased cerebral (R)-[11C]PK11195 uptake and glutamate release in a rat model of traumatic brain injury: a longitudinal pilot study *Journal of Neuroinflammation*8:67
- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., Srikrishna, G., 2011.** S100A8/A9 activates key genes and pathways in colon tumor progression. *Molecular cancer research* 9(2):133-148.
- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., Srikrishna, G., 2011.** S100A8/A9 activates key genes and pathways in colon tumor progression. *Molecular cancer research* 9(2):133-148.

- Ikeda, M., Ikeda-Sagara, M., Okada, T., Clement, P., Urade, Y., Nagai, T., Sugiyama, T., Yoshioka, T., Honda, K., Inoué, S., 2005. Brain oxidation is an initial process in sleep induction. *Neuroscience* 130(4):1029-40
- Irwin, M.R., Wang, M., Campomayor, C.O., Collado-Hidalgo, A., Cole, S., 2006. Sleep deprivation and activation of morning levels of cellular and genomic markers of inflammation. *Arch Intern Med.* 166(16):1756-62.
- Irwin, M., Thompson, J., Miller, C., Gillin, J.C, Ziegler, M., 1999. Effects of sleep and sleep deprivation on catecholamine and interleukin-2 levels in humans: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 84(6):1979-85.
- Irwin, M.R., Rinetti, G., 2004. Disordered sleep, nocturnal cytokines, and immunity: interactions between alcohol dependence and African-American ethnicity. *Alcohol* 32(1):53-61.
- Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, Worthen GS. Induction of Cxcl5 during inflammation in the rodent lung involves activation of alveolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005a;32:531–539.
- Jevtovic-Todorovic, V., Todorovic, S.M., Mennerick, S., 1998. Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat Med* 4:460-463
- Jin, K., Lombardi, D.A., Courtney, T.K., 2012. A case-crossover study of work-related acute traumatic hand injuries in the People’s Republic of China. *Scand J Work Environ Health.* 38: 163–70.
- Johnston, L.D., O’Malley, P.M., Bachman, J.G., Johnston, L.D., O’Malley, P.M. Bachman, J.G., 2002. *Monitoring the Future: National Survey Results on Monitoring the Future: National Survey Results on Drug Use, 1975-2001. Vol. II: College Students and Adults Drug Use, 1975-2001. Vol. II: College Students and Adults Aged 19-40*
- Johnson, C.M., Hill, C.S., Chawla, S., Treisman, R., Bading, H., 1997. Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci.* 17(16):6189-202.
- Johnson, V.E., Stewart, W., Smith, D.H., 2013. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 246:35-43.
- Jouvet, M., 1967. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol Rev.* 47:117-177.
- Kafitz, K.W., Rose, C.R., Thoenen, H., Konnerth, A., 1999. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401(6756):918-21.
- Kawaguchi, M., Furuya, H., Patel, P.M., 2005. Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J Anesth* 19:150-156
- Keenan, S., Hirshkowitz, M., 2011. *Monitoring and staging human sleep. Principles and practice of sleep medicine.* 5th edition 1602-1609.
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G.D., Herzog, E.D., Volk, H.D., Kramer, A., Maier, B., 2009. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 21407–21412.

- Kelley, B.J., Farkas, O., Lifshitz, J., Povlishock, J.T 2006. Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultrarapid secondary axotomy and Wallerian degeneration. *Exp Neurol* 198:350-360
- Khoury, S., Chouchou, F., Amzica, F., Giguère, J.F., Denis, R., Rouleau, G.A., Lavigne, G.J., 2013. Rapid EEG activity during sleep dominates in mild traumatic brain injury patients with acute pain. *J Neurotrauma* 15;30(8):633-41
- Killgore, W.D., 2010. Effects of sleep deprivation on cognition. *Prog Brain Res.* 185:105-29.
- King, D.P, Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W., Takahashi, J.S., 1997. *Cell.* 641-53.
- Kraus, M.F., Susmaras, T., Caughlin, B.P., Walker, C.J., Sweeney, J.A., Little, D.M., White matter integrity and cognition in chronic traumatic brain injury: A diffusion tensor imaging study. *Brain.* 2007;130:2508–2519.
- Krueger, J.M., Clinton, J.M., Winters, B.D., Zielinski, M.R., Taishi, P., Jewett, K.A., Davis, C.J., 2011. Involvement of cytokines in slow wave sleep. *Prog Brain Res* 193:39-47.
- Krueger, J.M., Obál, F., Fang, J., 1999. Why we sleep: a theoretical view of sleep function. *Sleep Med Rev* 3(2):119-29.
- Krueger, J.M., Obál, F.J., Fang, J., Kubota, T., Taishi, P., 2001. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 933:211-21
- Krueger, J.M., Toth, L.A., 1994. Cytokines as regulators of sleep *Ann NY Acad Sci.* 739:299-310.
- Krueger, J.M., Rector, D.M., Churchill, L., 2007. Sleep and cytokines. *Sleep Med Clin* 2:161-169
- Krueger, J.M., Takahashi, S., Kapas, L., 1995. Cytokines in sleep regulation. *Advances in Neuroimmunology* 5:171-188
- Krueger, J.M., Obál, F., Fang J., 1999. Why we sleep: a theoretical view of sleep function. *Sleep Med Rev.* (2):119-29.
- Krueger, J.M., Takahashi, S., Kapas, L., 1995. Cytokines in sleep regulation. *Advances in Neuroimmunology* 5:171-188
- Ko, CH., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. 271-7.
- Kochanek, A.R., Kline, A.E., Gao, W.M., Chadha, M., Lai, Y., Clark, R.S., Dixon, C.E., Jenkins, L.W., 2006. Gel-based hippocampal proteomic analysis 2 weeks following traumatic brain injury to immature rats using controlled cortical impact. *Dev Neurosci.* 28:410–419

- Kurzrock, R., 2001.** The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer*. 92(6 Suppl):1684-8.
- Lavie, P., 2001.** Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol*. 277-303
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., Appel, S.H., 2012.** Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS.. *Exp Neurol* 237(1):147-52.
- Lin, H.R., Van Der Kraak, G., Liang, J.Y., Peng, C., Li, G.Y., Lu, L.Z., Zhou, X.J., Chang, M.L., and Peter, R.E., 1986.** The effects of LHRH analogue and drugs which block the effects of dopamine on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China. *Aquaculture of Cyprinids*. INRA, Paris, France, pp. 139- 150.
- Lindsberg, P.J., Frerichs, K.U., Burris, J.A., Hallenbeck, J.M., Feuerstein, G., 1991.** Cortical microcirculation in a new model of focal laser-induced secondary brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 11(1):88-98.
- Lipsky, R.H., Sparling, M.B., Ryan, L.M., Xu, K., Salazar, A.M., Goldman, D., Warden, D.L., 2005.** Association of COMT Val158Met genotype with executive functioning following traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 17(4):465-71.
- Loane, D.J., Byrnes, K.R., 2010.** Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7(4):366-77.
- Lusardi, T.A., 2009.** Adenosine neuromodulation and traumatic brain injury. *Curr Neuropharmacol* 7(3):228-37
- Macciocchi, S.N., Reid, D.B., Barth, J.T., 1993.** Disability following head injury. *Curr Opin Neurol*. (5):773-7.
- Mahmood, O., Rapport, L.J., Hanks, R.A., Fichtenberg, N.L., 2004.** Neuropsychological performance and sleep disturbance following traumatic brain injury. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 19(5), 378–390.
- Mackiewicz, M., Shockley, K.R., Romer, M.A., Galante, R.J., Zimmerman, J.E., Naidoo, N., Baldwin, D.A., Jensen, S.T., Churchill, G.A., Pack, A.I., 2007.** Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics*. 14;31(3):441-57.
- Mackiewicz, M., Zimmerman, J.E., Shockley, K.R., Churchill, G.A., Pack, A.I., 2009.** What are microarrays teaching us about sleep?. *Trends Mol Med*. 15(2):79-87.
- Mackiewicz, M., Shockley, K.R., Romer, M.A., Galante, R.J., Zimmerman, J.E., Naidoo, N., Baldwin, D.A., Jensen, S.T., Churchill, G.A., Pack, A.I., 2007.** Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics*. 14;31(3):441-57.
- Makley, M. J., Johnson-Greene, L., Tarwater, P.M., Kreuz, A.J., Spiro, J., Rao, V., Celnik, Peldt A., 2009.** Return of memory and sleep efficiency following moderate to severe closed head injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 23(4), 320–326.
- Makley, M. J., Johnson-Greene, L., Tarwater, P.M., Kreuz, A.J., Spiro, J., Rao, V., Celnik, Peldt A., 2009.** Return of memory and sleep efficiency following moderate to severe closed head injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 23(4), 320–326.

- Maquet, P., Degueldre, C., Delfiore, G., Aerts, J., Péters, J.M., Luxen, A., Franck, G., 1997. Functional Neuroanatomy of Human Slow Wave Sleep. The Journal of Neuroscience. 2807-2812;**
- Maquet, P., Degueldre, C., Delfiore, G., Aerts, J., Péters, J.M., Luxen, A., Franck, G., 1997. Functional Neuroanatomy of Human Slow Wave Sleep. The Journal of Neuroscience. 2807-2812;**
- Maret, S., Dorsaz, S., Gurcel, L., Pradervand, S., Petit, B., Pfister, C., Hagenbuchle, O., O'Hara, B.F., Franken, P., Tafti, M., 2007. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss.. Proc Natl Acad Sci U S A 104(50):20090-5.**
- Maret, S., Dorsaz, S., Gurcel, L., Pradervand, S., Petit, B., Pfister, C., Hagenbuchle, O., O'Hara, B.F., Franken, P., Tafti, M., 2007. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;104(50):20090-5.**
- Maret, S., Dorsaz, S., Gurcel, L., Pradervand, S., Petit, B., Pfister, C., Hagenbuchle, O., O'Hara, B.F., Franken, P., Tafti, M., 2007. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;104(50):20090-5.**
- Marshall, K.R., Holland, S.L., Meyer, K.S., Martin, E.M., Wilmore, M., Grimes, J.B., 2012. Mild traumatic brain injury screening, diagnosis, and treatment. Mil Med 177(8 Suppl):67-75.**
- Marshall, K.R., Holland, S.L., Meyer, K.S., Martin, E.M., Wilmore, M., Grimes, J.B., 2012. Mild traumatic brain injury screening, diagnosis, and treatment. Mil Med 177(8 Suppl):67-75.**
- Martinez-Vargas, M., Estrada, Rojo, F., Tabla-Ramon, E., Navarro-Argüelles, H., Ortiz-Lailzon, N., Hernández-Chávez, A., Solis, B., Martínez Tapia, R., Perez Arredondo, A., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Nava-Talavera, K., Navarro, L., 2012 Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat. Neurosci Lett 529(2):118-22.**
- Martinez-Vargas, M., Gonzalez-Rivera, R., Soto-Nuñez, M., Cisneros-Martinez, M., Huerta-Saquero, A., Morales-Gomez, J., Molina-Guarneros, J., Navarro, L., 2006. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations effect of cystatin C Neurosci Lett. 400(1-2):21-4.**
- McAfoose, J., Baune, B.T., Toledo, E., Lebel, A., Becerra, L., Minster, A., Linnman, C., Maleki, N., Dodick, D.W., Borsook, D., 2012. Evidence for a cytokine model of cognitive function. The young brain and concussion: imaging as a biomarker for diagnosis and prognosis. 2009 Neurosci Biobehav Rev. 33(3):355-66.**
- McCormick, D.A., Bal, T., 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. Annu. Rev. Neurosci. 20, 185–215**
- McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G., Magee, J.C., 2003. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons.**
- McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G., Magee, J.C., 2003. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons J Neurosci. 22;23(29):9687-95.**

- McIntosh, T.K., Vink, R., Soares, H., Hayes, R., Simon, R., 1990. Effect of noncompetitive blockade of n-methyl-d-aspartate receptors on the neurochemical sequelae of experimental brain injury. *J Neurochem* 55:1170-1179
- McPhail, L.T., Stirling, D.P., Tetzlaff, W., Kwiecien, J.M., Ramer, M.S. 2004. The contribution of activated phagocytes and myelin degeneration to axonal retraction/dieback following spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 20(8):1984-94.
- Milman, A., Rosenberg, A., Weizman, R., and Pick, C.G.. *Journal of Neurotrauma*. September 2005, 22(9): 1003-1010. doi:10.1089/neu.2005.22.1003.
- Meier-Ewert, H.K., Ridker, P.M., Rifai, N., Regan, M.M., Price, N.J., Dinges, D.F., Mullington, J.M., 2004. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 18;43(4):678-83.
- Moretti, D., Frisoni, G., Fracassi, C., Pievani, M., Geroldi, C., Binetti, G., 2011. MCI patients' EEGs show group differences between those who progress and those who do not progress to AD. *Neurobiol. Aging* 32, 563–571.
- Morganti-Kossmann, M.C., Rancan, M., Stahel, P.F., Kossmann, T., 2002. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8(2):101-5
- Mtchedlishvili, Z., Lepsveridze, E., Xu, H., Kharlamov, E.A., Lu, B., Kelly, K.M., 2010. Increase of GABAA receptor-mediated tonic inhibition in dentate granule cells after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 38(3):464-75.
- Nagelhus, E.A., Ottersen, O.P., 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol. Rev.* 93, 1543–1562.
- Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., Araque, A., 2012. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol*. 10(2):e1001259.
- Neumann, H., Kotter, M.R., Franklin, R.J., 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288 –295.
- Nilsson, G.E., Lutz, P.L., 1993. Role of GABA in hypoxia tolerance, metabolic depression and hibernation – possible links to neurotransmitter evolution. *Comp. Biochem. Physiol. C* 105, 329-336.
- Nilsson, P., Ronne-Engstrom, E., 1994. Epileptic seizure activity in the acute phase following cortical impact trauma in rat. *Brain Res* 637(1-2): 227-32
- Odinak, M.M., Zhivolupov, S.A., Panomarev, V.V., Rashidov, N.A., Samartsev, I.N., 2014. Recovery of consciousness as manifestation of neuroplasticity. *Zh Vopr Neurokhir Im NN Burdenko* 78(1):33-41.
- Ohlmann, K.K., O'Sullivan, M.I., 2009. The costs of short sleep. *AAOHN J* 57(9):381-385.
- O'Neill, L.A., Kaltschmidt, C., 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20(6):252-8
- Opii, W.O., Nukala, V.N., Sultana, R., Pandya, J.D., Day, K.M., Merchant, M.L., Klein, J.B., Sullivan, P.G., Butterfield, D.A., 2007. Proteomic identification of oxidized

mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24:772–789

Ouellet, M.C., Morin, C.M., 2006. Subjective and objective measures of insomnia in the context of traumatic brain injury: a preliminary study. *Sleep Med* 7(6):486-97.

Palagini, L., Rosenlicht, N., 2011 Sleep, dreaming, and mental health: a review of historical and neurobiological perspectives, *Sleep Med Rev.* 15(3):179-86.

Palchykova, S., Winsky-Sommerer, R., Meerlo, P., Dürr, R., Tobler, I., 2006. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. Less effective executive functioning after one night's sleep deprivation *Neurobiol Learn Mem.* 85(3):263-71

Palmer, A.R., Strobeck, C., Chippindale, A.K., 1993. Bilateral variation and the evolutionary origin of macroscopic asymmetries. *Genetica* 89:201-218.

Papanicolaou, D.A., Wilder, R.L., Manolagas, S.C., Chrousos, G.P., 1998. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine.* 128:127–137.

Pappius, H.M., 1991. Brain injury: new insights into neurotransmitter and receptor mechanisms. *Neurochem Res* ;16(9):941-9.

Passani, M.B., Blandina, P., 2011. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* 32(4):242-9.

Patel, P.M., Drummond, J.C., Cole, D.J., Goskowitz, R.L., 1995. Isoflurane reduces ischemia-induced glutamate release in rats subjected to forebrain ischemia. *Anesthesiology* 82:996-1003

Pedley, T.A., Traub, R.D., 1990. Physiological basis of the EEG. In: *Neuronal Activities and Information Processing. Current practice of clinical electroencephalography.* Raven Press. 107-137.

Peng, Y., Jiang, L., Lee, D.Y., Schachter, S. C., Ma, Z., Lemere, C.A. 2006. Effects of huperzine A on amyloid precursor protein processing and beta-amyloid generation in human embryonic kidney 293 APP Swedish mutant cells. *J. Neurosci. Res.* 84, 903–911

Petchprapai, N., Winkelman, C., 2007. Mild traumatic brain injury, Determinants and subsequent quality of life. A review of the literature. *Journal of Neuroscience Nursing,* 39(5), 260-72.

Petrzilka, S., Taraborrelli, C., Cavadini, G., Fontana, A., Birchler, T., 2009. Clock gene modulation by TNF-alpha depends on calcium and p38 MAP kinase signaling. *J Biol Rhythms.* ;24:283–294.

Phillis, J.W., Goshgarian, H.G., 2001. Adenosine and neurotrauma: therapeutic perspectives. *Neurol Res* 23(2-3):183-9.

Pickering, M., Cumiskey, D., O'Connor, J.J., 2005. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol.* 90(5):663-70.

Pleines, U.E., Morganti-Kossmann, M.C., Rancan, M., Joller, H., Trentz, O., Kossmann, T., 2001. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal

specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury ; J Neurotrauma. 18(5):491-8.

- Postler, E., Lehr, A., Schluesener, H., Meyermann, R., 1997. Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19(1):27-34.
- Prewitt, C.M., Niesman, I.R., Kane, C.J., Houlé, J.D., 1997. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord.. *Exp Neurol* 148(2):433-43.
- Prins, M., Greco, T., Alexander, D., Giza, C.C., 2013. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Dis Model Mech*
- Prins, M., Greco, T., Alexander, D., Giza, C.C., 2013. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Dis Model Mech*
- Rachalski, A., Freyburger, M., Mongrain, V., 2014. Contribution of transcriptional and translational mechanisms to the recovery aspect of sleep regulation. *Ann Med.* 46(2):62-72.
- Raghupathi, R., Graham, D.I., McIntosh, T.K., 2000. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 17:927–938.
- Rall, J.M., Matzilevich, D.A., Dash, P.K., 2003. Comparative analysis of mRNA levels in the frontal cortex and the hippocampus in the basal state and in response to experimental brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(2):118-31.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* 975–978.
- Rao, D.A., Eid, R.E., Qin, L., Yi, T., Kirkiles-Smith, N.C., Tellides, G., Pober, J.S., 2008. Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection. *J Exp Med.* 205(13):3145-58
- Rapoport, M.J., Feinstein, A., 2000. Outcome following traumatic brain injury in the elderly: a critical review. *Brain Inj.* 14(8):749-61
- Redwine, L., Hauger, R.L., Gillin, J.C., Irwin, M., 2000. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85(10):3597-603.
- Reshef, A., Shirvan, A., Shohami, E., Grimberg, H., Levin, G., Cohen, A., Trembovler, V., Ziv, I., 2008. Targeting cell death in vivo in experimental traumatic brain injury by a novel molecular probe. *J Neurotrauma* 25(6):569-80
- Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, Salman NJ, White F, Fillmore H, Bullock MR 2003 Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 183(2):406-17.
- Roffwarg, H.P., Muzio, J.N., Dement, W.C., 1966. Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science.* 152(3722):604-19.
- Rosi, S., 2011. Neuroinflammation and the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Brain Behav Immun.* 1:S39-49
- Rothman JE. 1987 Protein sorting by selective retention in the endoplasmic reticulum and Golgi stack. *Cell.* 14;50(4):521-2.

- Ruscher, K., Isaev, N., Trendelenburg, G., Weih, M., Iurato, L., Meisel, A., Dirnagl, U., 1998. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 254(2):117-20.
- Santello, M., Cali, C., Bezzi, P., 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 970:307-31
- Santello, M., Cali, C., Bezzi, P., 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 307–331.
- Scharf, M.T., Naidoo, N., Zimmerman, J.E., Pack, A.I., 2008. The energy hypothesis of sleep revisited. *Prog Neurobiol* Nov;86(3):264-80
- Schirmer, L., Merkler, D., König, F.B., Brück, W., Stadelmann, C., 2013. Neuroaxonal regeneration is more pronounced in early multiple sclerosis than in traumatic brain injury lesions. *Brain Pathol* 23(1):2-12.
- Shelton, M.K., McCarthy, K.D., 2000. Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J Neurochem* 74(2):555-63.
- Shelton, M.K., McCarthy, K.D. 2000. Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J. Neurochem.* 74, 555–563.
- Sheng, M., Greenberg, M.E., 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477–485
- Shetty, A.K, Mishra, V., Kodali, M., and Hattiangady, B., 2014. Blood brain barrier dysfunction and delayed neurological deficits in mild traumatic brain injury induced by blast shock waves. *Front. Cell. Neurosci.* 8:232.
- Shitaka, Y., Tran, H.T., Bennett, R.E., Sanchez, L., Levy, M.A., Dikranian, K., Brody, D.L., 2011 Repetitive closed-skull traumatic brain injury in mice causes persistent multifocal axonal injury and microglial reactivity. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(7):551-67.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A.B., Aschner, M., 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 39(1):115-23
- Singh, R., Kiloung, J., Singh, S., Sharma, D., 2008. Effect of paradoxical sleep deprivation on oxidative stress parameters in brain regions of adult and old rats. *Biogerontology.* 9(3):153-62.
- Siopi, E., Calabria, S., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Jafarian-Tehrani, M., 2012. Minocycline restores olfactory bulb volume and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 29(2):354-61.
- Siopi, E., Cho, A.H., Homsy, S., Croci, N., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Jafarian-Tehrani, M., 2011. Minocycline restores sAPP α levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 28(10):2135-43.
- Skopin, M.D., Kabadi, S.V., Viechweg, S.S., Mong, J.A., Faden, A.I., 2014. Chronic Decrease in Wakefulness and Disruption of Sleep-Wake Behavior after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*
- Skulachev, V.P., 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11, 473–485.

- Smith, D.H., Okiyama, K., Gennarelli, T.A., McIntosh, T.K., 1993. Magnesium and ketamine attenuate cognitive dysfunction following experimental brain injury. *Neuroscience letters* 157:211-214
- Smith, M.T., Perlis, M.L., Park, A., Smith, M.S., Pennington, J., Giles, D.E., Buysse, D.J., 2002. Comparative meta-analysis of pharmacotherapy and behavior therapy for persistent insomnia. *Am J Psychiatry*. 159(1):5-11.
- Spanevello, M.D., Tajouri, S.I., Mirciov, C., Kurniawan, N., Pearse, M.J., Fabri, L.J., Owczarek, C.M., Hardy, M.P., Bradford, R.A., Ramunno, M.L., Turnley, A.M., Ruitenber, M.J., Boyd, A.W., Bartlett, P.F., 2013. Acute delivery of EphA4-Fc improves functional recovery after contusive spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 30(12):1023-34.
- Spiegel, K., Sheridan, J.F., Van Cauter, E., 2002. Effect of sleep deprivation on response to immunization. *JAMA*. 288(12):1471-2.
- Stahel, P.F., Kariya, K., Shohami, E., Barnum, S.R., Eugster, H., Trentz, O., Kossmann, T., Morganti-Kossmann, M.C., 2000. Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol* 109(2):164-7
- Stahel, P.F., Smith, W.R., Moore, E.E., 2009. Current trends in resuscitation strategy for the multiply injured patient. *Injury* 40(4):S27-35.
- Strawn, J.R., Adler, C.M., Fleck, D.E., Hanseman, D., Maue, D.K., Bitter, S., Kraft, E.M., Geraciotti, T.D., Strakowski, S.M., DelBello, M.P., 2010. Post-traumatic stress symptoms and trauma exposure in youth with first episode bipolar disorder. *Early Interv Psychiatry*. ;4(2):169-73
- Statler, K.D., Kochanek, P.M., Dixon, C.E., 2000. Isoflurane improves long-term neurologic outcome versus fentanyl after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma* 17:1179-118
- Statler, K.D., Alexander, H., Vagni, V., 2006. Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury. *Brain research* 1076:216-224
- Strecker, R.E., Morairty, S., Thakkar, M.M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin, L.J., Rainnie, D.G., Portas C. M., Greene, R.W., McCarley, R.W., 2000. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav. Brain Res.* 115, 183–204
- Tada, T., Sheng, M., 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 95–101
- Taishi, P., Sanchez, C., Wang, Y., Fang, J., Harding, J.W., Krueger, J.M., 2001. Conditions that affect sleep alter the expression of molecules associated with synaptic plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:839–845.
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., Hirase, H., 2011. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci.* 7;31(49):18155-65.

- Tay, S.Y., Ang, B.T., Lau, X.Y., Meyyappan, A., Collinson, S.L., 2010. Chronic impairment of prospective memory after mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. Jan;27(1):77-83.
- Teasdale, G., Jennett, B., 1974. "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale." *Lancet* 2(7872): 81-4.
- Tham, SW., Palermo, T.M., Vavilala, M.S., Wang, J., Jaffe, K.M., Koepsell, T.D., Dorsch, A., Temkin, N., Durbin, D., Rivara, F.P., 2012. The longitudinal course, risk factors, and impact of sleep disturbances in children with traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 29(1):154-61.
- Theeler, B., Lucas, S., Riechers, R.G., Ruff, R.L., 2013. Post-traumatic headaches in civilians and military personnel: a comparative, clinical review. *Headache* 53(6):881-900
- 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, TS., Lein, E.S., 2010. Molecular and anatomical signatures of sleep deprivation in the mouse brain. *Front Neurosci*. 21;4:165.
- Todd, K.J., Serrano, A., Lacaille, J.C., Robitaille, R., 2006. Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* 99(2-3):75-83
- Tononi, G., Cirelli, C., 2003. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res Bull* 62:143-150
- Tononi, G., Cirelli, C., 2006. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 10:49-62
- Tononi, G., Cirelli, C., 2006. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev*. (1):49-62.
- Tononi, G., Cirelli, C., 2013. Perchance to prune. During sleep, the brain weakens the connections among nerve cells, apparently conserving energy and, paradoxically, aiding memory. *Sci Am*. 309(2):34-9.
- Ucar, T., Ozkaya, G., Demir, N., Gurer, I., Akyuz, M., Onal, M.Z., 2005. The effects of environmental light-dark changes on experimental mild traumatic brain injury. *Acta Neurol Scand* 112(3):163-72.
- Valko, P.O., Gavrilov, Y.V., Yamamoto, M., Finn, K., Reddy, H., Haybaeck, J., Weis, S., Scammell, T.E., Baumann, C.R., 2015. Damage to histaminergic tuberomammillary neurons and other hypothalamic neurons with traumatic brain injury. *Ann Neurol* 77(1):177-82.
- Van Haasteren, G., Li, S., Muda, M., Susini, S., Schlegel, W., 1999. Calcium signalling and gene expression. *J Recept Signal Transduct Res* 19(1-4):481-92.
- Van Someren, E.J., Van Der Werf, Y.D., Roelfsema, P.R., Mansvelder, H.D., da Silva, F.H., 2011. Slow brain oscillations of sleep, resting state, and vigilance. *Prog Brain Res*. 193:3-15.
- Varshavsky, A., 2012. Augmented generation of protein fragments during wakefulness as the molecular cause of sleep: a hypothesis *Protein Sci*. 21(11):1634-61.

- Vecsey, C.G., Peixoto, L., Choi, J.H.K., Wimmer, M., Jaganath, D., Hernandez, P.J., Blackwell, J., Meda, K., Park, A.J., Hannenhalli, S., 2012.** Genomic analysis of sleep deprivation reveals translational regulation in the hippocampus. *Physiol Genomics* 44: 981–991.
- Vgontzas, A.N., Papanicolaou, D.A., Bixler, E.O., Lotsikas, A., Zachman, K., Kales, A., Prolo, P., Wong, M.L., Licinio, J., Gold, P.W., Hermida, R.C., Mastorakos, G., Chrousos, G.P., 1999.** Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(8):2603-7.
- Vgontzas, A.N., Papanicolaou, D.A., Bixler, E.O., Kales, A., Tyson, K., Chrousos, G.P., 1997.** Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 82(5):1313-6.
- Vgontzas, A.N., Zoumakis, E., Bixler, E.O., Li, H.M., Follett, H., Kales, A., Chrousos, G.P., 2004.** effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Clin Endocrinol Metab* 89(5):2119-26
- Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., Levine, A., Alkadhi, K., Salim, S., 2011.** Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav Brain Res.* 31;224(2):233-40.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupe, P., Barillot, E., Soumelis, V., 2008.** A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* 9, 650–657.
- Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Tononi, G., 2011.** Electrophysiological correlates of sleep homeostasis in freely behaving rats. *Prog Brain Res.* 193:17-38.
- Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., P, Fister-Genskow, M., Faraguna, U., Tononi, G., 2008.** Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat Neurosci.* 200-8.
- Vyazovskiy, V.V., Harris, K.D., 2013.** Sleep and the single neuron: the role of global slow oscillations in individual cell rest. *Nat Rev Neurosci.* 14:443–451
- Wang, H., Liu, Y., Briesemann, M., Yan, J., 2010.** Computational analysis of gene regulation in animal sleep deprivation. *Physiol Genomics* 42: 427–436.
- Wang, F., Smith, N.A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T., Bekar, L., Nedergaard, M., 2012.** Astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-dependent uptake of extracellular K⁺. *Sci Signal* 5(218):ra26.
- Wang, D.L., Wung, B.S., Shyy, Y.J., Lin, C.F., Chao, Y.J., Usami, S., Chien, S., 1995.** Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells. *Circ Res* 77(2):294-302.
- Ward, J.L., Harting, M.T., Cox, C.S., Jr., Mercer, D.W., 2011.** Effects of ketamine on endotoxin and traumatic brain injury induced cytokine production in the rat. *The Journal of trauma* 70:1471-147.

- Waters, R.J., Murray, G.D., Teasdale, G.M., Stewart, J., Day, I., Lee, R.J., Nicoll, J.A., 2013.** Cytokine gene polymorphisms and outcome after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 15;30(20):1710-6.
- Waxman, E.A., Lynch, D.R., 2005.** N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11(1):37-49.
- Westergaard, N., Sonnewald, U., Schousboe, A., 1995.** Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev. Neurosci.* 17, 203–211
- Wiseman-Hakes, C., Victor, J.C., Brandys, C., Murray, B.J., 2011.** Impact of post-traumatic hypersomnia on functional recovery of cognition and communication. *Brain Inj.* ;25(12):1256-65
- Wiseman-Hakes, C., Murray, B., Moineddin, R., Rochon, E., Cullen, N., Gargaro J., Colantonio, A., 2013.** Evaluating the impact of treatment for sleep/wake disorders on recovery of cognition and communication in adults with chronic TBI. *Brain Inj* 27(12):1364-76.
- Wilde, M.C., Castriotta, R.J., Lai, J.M., Atanasov, S., Masel, B.E., Kuna, S.T., 2007.** Cognitive impairment in patients with traumatic brain injury and obstructive sleep apnea. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 88(10), 1284–1288.
- Woodcock, T., Morganti-Kossmann, M.C., 2013.** The role of markers of inflammation in traumatic brain injury.. *Front Neurol*. 2013 Mar 4;4:18.
- Wright KP1, Lowry CA, Lebourgeois MK (2012)** Circadian and wakefulness-sleep modulation of cognition in humans *Front Mol Neurosci* 18;5:50.
- Wiseman-Hakes, C., MacDonald, S., Keightley, M., 2010.** Perspectives on evidence based practice in ABI rehabilitation. "Relevant Research": who decides? *NeuroRehabilitation* 26(4):355-68.
- Xu, Y.D., Yin, L.M., Wang, Y., Wei, Y., Yang, Y.Q., 2012.** S100A8 protein in inflammation. *Sheng Li Xue Bao* 64(2):231-7.
- Yang, N., Dai, S.S., Ning, Y.L., Chen, X.Y., Zhao, Y., Li, P., Zhou, Y.G., Sheng Li Xue Bao. 2010.** Effect of (S)-4C3HPG on brain damage in the acute stage of moderate traumatic brain injury model of mice and underlying mechanism. 62(6):555-9.
- Yang, S.H., Gustafson, J., Gangidine, M., Stepien, D., Schuster, R., Pritts, T.A., Goodman, M.D., Remick, D.G., Lentsch, A.B., 2013.** A murine model of mild traumatic brain injury exhibiting cognitive and motor deficits. *J Surg Res* 184(2):981-8.
- Yang, K., Perez-Polo, J.R., Mu, X.S., Yan, H.Q., Xue, J.J., Iwamoto, Y., Liu, S.J., Dixon, C.E., Hayes, R.L., 1996.** Increased expression of brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 mRNA in rat brain after cortical impact injury. *J Neurosci Res* 44(2):157-64.
- Yasuda, T., Yoshida, H., Garcia-Garcia, F., Kay, D., Krueger, J.M., 2005.** Interleukin-1beta has a role in cerebral cortical state-dependent electro-encephalographic slow-wave activity. *Sleep.* ;28:177–184

- Yaundong, L., Dongyan, W., Lijun, H., Zhibo, X., 2014. Effects of downregulation of S100A8 protein expression on cell cycle and apoptosis of fibroblasts derived from hypertrophic scars. *Aesthet Surg J* 34(1):160-7.
- Yi, X., Jin, G., Zhang, X., Mao, W., Li, H., Qin, J., Shi, J., Dai, K., Zhang, F., 2013. Cortical endogenic neural regeneration of adult rat after traumatic brain injury. *PLoS One* Jul 29;8(7):e70306.
- Yoo, S., Gujar, N., Hu, P., Jolesz, F., Walker, M.P., 2007. The human emotional brain without sleep: A prefrontal amygdala disconnect. *Current Biology*, 17(20), 877–878.
- Yoshida, K., Hashimoto, T., Yoshitada, S., Hashiramoto, A., 2014. Involvement of the Circadian Rhythm and Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. 282495-6
- Young, M.W., Kay, S.A., 2001. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Nat Rev Genet*. 702-15.
- Youngblood, B.D., Zhou, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H., Harris, R.B., 1997. Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory. *Physiol Behav*. 61(2):249-56.
- Yuvaraj R, Murugappan M, Ibrahim NM, Sundaraj K, Omar MI, Mohamad K, Palaniappan R, Satiyan M 2015 Inter-hemispheric EEG coherence analysis in Parkinson's disease: Assessing brain activity during emotion processing. *J Neural Transm*122(2):237-52
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. 2003. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:9779–9784.
- Zhou, S., Sun, X.C., 2012. Influence of apolipoprotein E and its receptors on cerebral amyloid precursor protein metabolism following traumatic brain injury. *Chin J Traumatol* 15(3):183-7
- Zielinski MR, Krueger JM. 2011 Sleep and innate immunity. 1;3:632-42.
- Zielinski, M.R., Kim, Y., Karpova, S.A., McCarley, R.W., Strecker, R.E., Gerashchenko, D., 2014. Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neurosci Lett* 580:27-31.
- Ziebell, M.J., Taylor E.S., Cao, T., Harrison J.L., Lifshitz, J., 2012. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury *Journal of Neuroinflammation* 9:247
- Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Verkhratsky, A., Parpura, V., 2012. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro*. 22;4(2).