

**Université de Montréal**

**Étude de l'implication de la Neurologine 1 dans le processus homéostatique de  
régulation du sommeil chez la souris**

**par Janine El Helou**

**Programme de sciences biomédicales, option sciences psychiatriques. Faculté  
de médecine**

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de  
maîtrise en sciences biomédicales option sciences psychiatriques

Février 2013

©, Janine El Helou, 2013

## Résumé

Le sommeil est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Ce dernier est régulé, entre autres, par le processus de régulation homéostatique qui dépend de la pression de sommeil accumulée suite à l'éveil. Des études ont suggéré que ce processus pourrait être lié à la plasticité synaptique, et que le changement de la pression de sommeil affecterait le degré de plasticité du cerveau. Les récepteurs N-méthyl-D-aspartate, des médiateurs importants de plasticité, semblent impliqués dans les conséquences délétères du manque de sommeil ainsi que dans la régulation de la synchronisation corticale caractéristique du sommeil lent profond. Leur activité est contrôlée par Neurologine 1 (NLGN1), une molécule d'adhésion synaptique. Une mutation de *Nlgn1* a des effets similaires à ceux de la privation de sommeil sur la mémoire et le comportement. Dans le manuscrit de mon mémoire, nous présentons l'hypothèse d'une implication de NLGN1 dans la régulation du sommeil et de l'éveil. Pour tester cette hypothèse, l'expression d'ARNm et de protéine NLGN1 a été mesurée suite à une privation de sommeil et le sommeil de souris n'exprimant pas NLGN1 a été caractérisé. Les résultats de mon projet de maîtrise montrent, en premier lieu, qu'une augmentation de la pression pour dormir altère l'expression de l'ARNm et de la protéine NLGN1 chez la souris. De plus, nos observations révèlent qu'une mutation de *Nlgn1* diminue la quantité d'éveil et modifie l'activité spectrale en éveil et en sommeil. Ces observations dévoilent l'importance de NLGN1 dans le maintien de l'éveil et la régulation du sommeil, et supportent un rôle de NLGN1 dans la régulation de l'activité neuronale.

**Mots clés :** Neurologine 1, plasticité synaptique, régulation sommeil/éveil, EEG, souris.

## **Abstract**

Sleep is essential for the well-functioning of the body. It has been suggested that sleep is regulated, in part, by the homeostatic process of sleep regulation which controls a pressure for sleep in function of the amount of time spent awake. Studies have suggested that the homeostatic process could be linked to synaptic plasticity, and that changes in sleep pressure can affect brain plasticity. N-methyl-D-aspartate receptors, which are important plasticity mediators, appear to be implicated in the deleterious effects related to sleep loss as well as in the regulation of cortical synchrony characteristic of slow wave sleep. Their activity is controlled by Neuroligin 1 (NLGN1), a synaptic adhesion molecule. Also, a *Nlgn1* mutation has similar effects on memory and behavior as those observed following a sleep deprivation. In this master's thesis, we hypothesized that NLGN1 is implicated in sleep and wake regulation. To test this hypothesis, *Nlgn1* mRNA and protein expression has been measured after sleep deprivation, and the sleep of mice lacking NLGN1 has been studied. The results of my research project show that an increase in sleep pressure changes *Nlgn1* mRNA and protein expression in mice. We also find that *Nlgn1* mutation reduces wake duration and modifies the EEG spectral composition during wake and sleep. These results indicate that NLGN1 is important in the maintenance of wakefulness and the regulation of sleep, and provide further support to a role for NLGN1 in the regulation of neuronal activity.

**Keywords:** Neuroligin 1, synaptic plasticity, sleep/wake regulation, EEG, mice.

## **Table des matières**

Résumé en français et mots clés français.....	ii
Résumé en anglais et mots clés anglais.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre 1. Introduction	
1.1. Mise en contexte.....	1
1.2. L'importance du sommeil pour le fonctionnement du corps : un survol	
1.2.1 Conséquences physiologiques d'un manque de sommeil.....	3
1.2.2 Sommeil et fonctionnement du cerveau.....	3
1.3 Les systèmes neuronaux impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil.....	5
1.4 Synchronie neuronale du sommeil à ondes lentes.....	6
1.5 Le modèle de régulation du sommeil à 2 processus	
1.5.1 Le processus homéostatique de régulation du sommeil.....	7
1.5.2 Le processus circadien de régulation du sommeil.....	10
1.5.3 Le rôle des gènes de l'horloge dans la régulation homéostatique du sommeil.....	11
1.6 L'hypothèse de l'homéostasie synaptique.....	12
1.7 L'hypothèse de l'homéostasie synaptique contestée.....	14
1.8 Les récepteurs NMDA	

1.8.1 Le fonctionnement et les propriétés des récepteurs NMDA.....	16
1.8.2 La composition et les ligands endogènes des récepteurs NMDA.....	16
1.8.3 Récepteurs NMDA et manque de sommeil.....	17
1.8.4 Les récepteurs NMDA et la synchronie corticale.....	18
1.9 Neuroligine 1	
1.9.1 La famille des Neuroligines.....	20
1.9.2 Les variants transcriptionnels de Neuroligine 1.....	21
1.9.3 Répartition de Neuroligine 1 et domaines protéiques.....	22
1.9.4 Le rôle de Neuroligine 1 dans la maturation synaptique.....	22
1.9.5 Le rôle de NLGN1 dans la transmission glutamatergique et autres effets sur le cerveau.....	24
Chapitre 2. Objectifs, hypothèses et contribution spécifique	
2.1 Objectifs.....	26
2.2 Hypothèses.....	26
2.3 Contribution spécifique de l’auteur principal.....	27
Préambule du Chapitre 3. Contribution des co-auteurs à l’article.....	28
Chapitre 3. Méthodologies et Résultats – Article de recherche	
Neuroigin-1: a Link between Neuronal Activity and Sleep/Wake Regulation.....	30

## Chapitre 4. Discussion

4.1. Rappel des résultats principaux.....	82
4.2. Effet d'un éveil prolongé sur l'expression génique de <i>Nlgn1</i> .....	82
4.3. Effet d'un éveil prolongé sur la quantité de protéine NLGN1.....	86
4.4. Sommeil et activité EEG chez des souris n'exprimant pas NLGN1.....	89
4.5. Régulation moléculaire de NLGN1.....	92
4.6. Limites et étapes suivantes.....	95
4.7. Perspectives et liens avec maladies mentales.....	100
4.8 Conclusion.....	103
Bibliographie.....	104

## **Liste des tableaux**

*Chapitre 3. Méthodologies et résultats - Article de recherche*

### Supplementary information

1. Sequences for primers and probes used for qPCR.....76

## **Liste des figures**

### *Chapitre 1. Introduction*

1. Représentation du pourcentage de l'activité à ondes lentes (SWA) en fonction du temps dans une simulation réalisée chez des sujets adolescents.....8
2. Représentation de l'hypothèse de l'homéostasie synaptique.....13
3. Modèle de l'implication de NLGN1-Neurexine lors de la synaptogenèse.....23

### *Chapitre 3. Méthodologies et résultats - Article de recherche*

1. Effect of sleep deprivation (SD) on the expression of *Nlg1* transcript variants in different mouse strains. Schematic view of the *Nlg1* mRNA (A), Relative expression of *Nlg1* transcripts in the forebrain of control or SD mice from B6 and AKR strains (B), Relative expression of *Nlg1* transcripts in the forebrain of control or SD mice from D2 strain submitted to Sham or adrenalectomy surgery (C).....77
2. Effect of SD on the level of NLG1 protein in different mouse strains. Western blot showing NLG1 levels in different regions and type of extractions of mice forebrain (A), Quantification of Western blots of NLG1 in B6 strain (B), Quantification of Western blots of NLG1 in AKR strain.....78



3. Effect of a *Nlg1* mutation on sleep structure and cortical synchrony. Duration of vigilance states in wild type (WT) and *Nlg1* Knock-out (KO) mice (A), Duration of vigilance states per hour in WT and KO mice (B), Mean duration of wake bouts in WT and KO mice (C), Spectral power calculated for the 3 vigilance states in WT and *Nlg1* KO mice (D), 24h time course of delta power in WT and KO mice (E), Relative expression of *Homer1a*, *Bdnf* and *Per2* in the forebrain of WT and *Nlg1* KO mice (F).....79

4. Time-of-day expression of *Nlg1* and binding of its gene by core clock transcription factors. Relative mRNA expression of the different *Nlg1* transcript variants measured at different times of the day (A), Diagram of the mouse, rat and human *Nlg1* gene showing the position of E-boxes surrounding the transcription start sites (B), Binding of BMAL1 and CLOCK to the canonical E-box of mouse *Nlg1* measured at different times of the day (C), Binding of BMAL1 and CLOCK to the canonical E-box of mouse *Nlg1* measured after SD (D), Model showing how elevated sleep pressure could change the expression of *Nlg1* (E).....80

### Supplementary information

1. Blot showing forebrain NLG1 level in WT (+/+) and *Nlg1* KO (-/-) mice (A), Neurological severity score (NSS) in WT and *Nlg1* KO mice (B), Social behavior in *Nlg1* KO mice and WT littermates (C), Percent response of brain hemodynamic parameters to forepaw stimulation

in WT and *Nlg1* KO mice (D), Oxy- and deoxyhemoglobin response of the cerebral cortex following forepaw stimulation for WT and *Nlg1* KO mice (E).....81

2. Time-of-day expression of *Nlg1* measured using the common probes.....81

## **Liste des abréviations**

*En français :*

AOL : activité à ondes lentes

ARNm : acide ribonucléique messenger

CamK, CamKII : protéine-Kinase  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline dépendante, 2

EEG : électroencéphalogramme

Fig. : figure

GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

Hz : hertz

KCl : chlorure de potassium

KO : *knockout*

$\text{Mg}^{2+}$  : ions Magnésium

MMP9 : métalloprotéase 9

NA : noradrenaline

NLGN, NLGN1, NLGN1A, NLGN1B, NLGN1AB : Neuroligine, Neuroligine 1, Neuroligine 1 contenant l'insert A, Neuroligine 1 contenant l'insert B, Neuroligine 1 contenant les inserts A et B

NR1, NR2, NR3 : sous-unité 1 du récepteur N-Méthyl-D-Aspartate, sous-unité 2, sous-unité 3

NRX : Neurexine

Processus C : processus circadien de régulation du sommeil

Processus S : processus homéostatique de régulation du sommeil

R-AMPA : récepteur  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

R-NMDA : récepteur N-méthyl-D-aspartate

SNAP25 : *Synaptoneurosomal-Associated Protein-25*.

SOL : sommeil à ondes lentes

THIP : 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridin-3-ol

*En anglais :*

ADX : adrenalectomized

ANOVA : analysis of variance

AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

Ant : anterior

Arc : Activity-mediated cytoskeleton-associated protein

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

C : control

°C : celsius degrees

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

DNA : deoxyribonucleic acid

DTT : dithiothreitol

EEG : electroencephalogram

EMG : electromyogram

Fig. : figure

g : measuring unit of gravitational force

GABA : gamma-aminobutyric acid

GusB : beta-Glucuronidase

h : hour

HbO : oxyhemoglobin

HbR : deoxyhemoglobin

Homer1a : homer protein homolog 1 a

Hspa4 : Heat shock protein

Hz : hertz

KO : Knock-out

mA : milliampere

mg/kg : milligram per kilogram

mM : millimolar

min : minutes

mRNA : messenger ribonucleic acid

ms : milliseconds

N1, N2, N3 : non-rapid eye movement sleep stage 1, 2, 3

NK : lymphocytes Natural killer

NLG, NLG1 : Neuroligin, Neuroligin 1

nm : nanometers

NMDAR : N-methyl-D-aspartate receptor

NREM : non-rapid eye movement

NRX : Neurexin

NSS : Neurological Severity Score

Pcdh10 : protocadherin-10

Pdk4 : pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4

PDZ : protein domain which name comes from a combination of three proteins: post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)

PBS : phosphate-buffered saline

Per2 : Period 2

Post : posterior

PSD-95 : post-synaptic density protein 95

qPCR : quantitative PCR

REM : Rapid eye movement

SWA : slow wave activity

ROI : Region of Interest

Rsp9 : radial spoke protein 9

Sec : seconds

SD : sleep deprivation

SI : Supporting Information

SN : synaptoneurosomal

SNAP25 : Synaptoneurosomal-Associated Protein-25

T-test : Student test

Tbp: TATA box binding protein

Tot : total

$\mu\text{m}$  : micrometers

WT : wild-type

ZT : zeitgeber time



# **Chapitre 1 : Introduction**

## **1.1 Mise en contexte**

Cette section présente une vue d'ensemble des différents éléments de la littérature qui seront traités dans cette introduction dans le but d'exposer la problématique de recherche.

Le sommeil est essentiel au bon fonctionnement physique et mental, et une dérégulation de celui-ci peut avoir de graves conséquences sur le corps. Afin d'étudier le sommeil des mammifères, une analyse électroencéphalographique (EEG) est effectuée, nous permettant de quantifier les stades de sommeil et d'étudier les changements observés suite à un éveil prolongé. Différents changements sont observés dans le cerveau, au niveau duquel un ensemble de processus chimiques et neurophysiologiques prennent place en fonction de l'état de vigilance. Chez les rongeurs, on retrouve 3 stades de vigilance : l'éveil, le sommeil à ondes lentes et le sommeil paradoxal. Le stade qui nous intéresse particulièrement est le sommeil à ondes lentes qui semble impliqué dans l'aspect récupérateur du sommeil. Cet aspect récupérateur, aussi connu comme étant le processus homéostatique de régulation du sommeil, définit une pression pour le sommeil qui augmente en fonction du temps d'éveil, et qui est reflétée par une augmentation de l'activité à ondes lentes pendant le sommeil à ondes lentes. Par contre, les mécanismes à la base de l'aspect récupérateur du sommeil ne sont pas bien compris.

Afin d'essayer d'élucider ce processus associé au besoin de dormir, une équipe de recherche a proposé une hypothèse nommée l'hypothèse d'homéostasie synaptique. Selon cette hypothèse, l'éveil est accompagné d'une augmentation générale de la force synaptique et c'est cette augmentation qui accroît l'activité à ondes lentes lors du sommeil subséquent. Pendant le sommeil, une dépression synaptique générale aurait plutôt lieu, ce qui donnerait lieu à une dissipation de l'activité à ondes lentes et permettrait de ramener le système à un niveau de base. Les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (R-NMDA) sont des récepteurs glutamatergiques dont le fonctionnement est modulé par l'éveil et le sommeil. Différentes évidences soulignent un rôle des R-NMDA dans la synchronie corticale, suggérant que les R-NMDA peuvent être responsables de la désynchronisation de l'activité neuronale au niveau du cortex cérébral pendant l'éveil. De plus, une diminution de leur activité, par exemple suite à une forte dose d'activité neuronale, engendrerait une synchronisation corticale. Neuroligine 1 est une protéine d'adhésion post-synaptique qui contrôle l'activité des R-NMDA. Elle est impliquée dans la maturation synaptique et son absence engendre des comportements similaires à ceux observés suite à un manque de sommeil. Pour ces raisons, nous avons émis l'hypothèse que Neuroligine 1 pourrait être impliquée dans la régulation du sommeil chez la souris.

## **1.2 L'importance du sommeil pour le fonctionnement du corps : un survol**

### *1.2.1 Conséquences physiologiques d'un manque de sommeil*

Le sommeil est une fonction essentielle au bon fonctionnement et à la survie de tous les mammifères, et un manque de sommeil peut avoir des conséquences néfastes sur la santé. En effet, différentes études réalisées chez les modèles aussi bien humains qu'animaux ont montré qu'une privation de sommeil peut avoir diverses conséquences à différents niveaux. Par exemple, on observe un débalancement du taux hormonal, tel le ratio ghréline/leptine qui est augmenté chez des sujets sains ayant subi une privation de sommeil (Schmid et al., 2008). On observe aussi une augmentation du niveau de stress qui se traduit par une augmentation du taux de corticostérone chez des souris privées de sommeil (Mongrain et al., 2010), menant à une altération au niveau de l'expression de gènes tels ceux encodant des protéines de choc thermique, Hspa4, des enzymes métaboliques Pdk4 ainsi que des protéines d'adhésion Pcdh10 (Mongrain et al., 2010). Finalement, un manque de sommeil produit aussi des altérations de la fonction immunitaire, ceci se traduisant en une diminution du taux d'Interleukine-2 et de lymphocytes NK après une privation partielle de sommeil (Irwin et al., 1996), et une augmentation du taux de neutrophiles dans différents organes tels les poumons et le foie après une privation de sommeil (Everson et al., 2008).

### *1.2.2 Sommeil et fonctionnement du cerveau*

D'autres effets observés suite à un manque de sommeil comprennent aussi une altération au niveau cognitif, impliquant la mémoire et la cognition. Le sommeil a été associé à différentes propriétés mnésiques. Par exemple, la privation de sommeil diminue la consolidation de la

mémoire reliée à la peur chez les rats (Kumar & Jha, 2012). De plus, Chowdhury et collaborateurs ont trouvé que des rats privés de sommeil performaient moins bien à une tâche de conditionnement que les rats non privés de sommeil, ceci indiquant que le manque de sommeil influence l'encodage de l'information apprise (Chowdhury et al., 2011). Ainsi, le sommeil semble bénéfique à l'encodage et la consolidation de la mémoire ainsi que d'autres propriétés mnésiques (Révision par Walker & Stickgold, 2004; Révision par Stickgold, 2005; Révision par Born et al., 2006).

Le sommeil n'est pas un état continu. En effet, il est séparé en plusieurs stades dépendamment de l'espèce. Chez la souris, il existe deux stades caractérisant le sommeil : le SOL et le sommeil paradoxal. Les différents stades de sommeil ont été associés à différentes propriétés mnésiques. Une privation de sommeil profond chez l'humain, et donc une atténuation du SOL engendre une diminution de la mémoire déclarative (Van Der Werf et al., 2011), ainsi qu'une diminution au niveau de la performance d'une tâche visuo-motrice (Landsness et al., 2009), reflétant un déficit au niveau de la mémoire procédurale. De plus, une privation de sommeil paradoxal ainsi que de sommeil total ont des conséquences négatives au niveau de la mémoire spatiale (Guan et al., 2004; Bjorness et al., 2005). Ces résultats suggèrent que chaque stade de sommeil est responsable de certains types de mémoire en particulier.

### **1.3 Les systèmes neuronaux impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil**

Il existe plusieurs systèmes responsables du maintien de l'éveil. Un de ces systèmes comprend une transmission excitatrice se faisant à travers des cellules cholinergiques situées au niveau du pons et projetant vers le thalamus (Steriade et al., 1990). Le système cholinergique n'est cependant pas le seul système responsable de l'éveil. En effet, on retrouve d'autres projections glutamatergiques et monoaminergiques (sérotonine ou norépinephrine) projetant vers le thalamus à partir du locus cœruleus et du raphé dorsal (Révision par Samuels & Szabadi, 2008). L'ensemble des systèmes responsables du maintien de l'éveil s'appelle le système réticulé activateur ascendant, décrit par Moruzzi & Magoun en 1949. Les neurones à orexine font aussi partie du système de maintien de l'éveil. Ces derniers reçoivent des afférences du locus cœruleus, du raphé dorsal, et d'autres structures du système réticulé activateur ascendant (*reticular arousal system*), et sont activés pendant l'éveil (Yoshida et al., 2006; Révision par Saper et al., 2010). La transition entre l'éveil et le sommeil se fait graduellement : le niveau d'excitation des différents systèmes change, ceci engendrant un changement dans les neurotransmetteurs sécrétés. En effet, au fur et à mesure qu'on progresse dans les stades de sommeil, le cerveau subit des changements neurochimiques. Pendant le SOL, il y a une diminution de la transmission cholinergique au niveau du tronc cérébral ainsi que du cerveau antérieur basal (*forebrain*; Semba, 2000), et aussi une diminution du taux de décharge sérotoninergique des neurones du raphé et du taux de décharge noradrénergique au niveau du locus cœruleus, par rapport à l'éveil (Révision par MCarley, 2007). Aussi, il y a une augmentation de la transmission GABAergique

(de type GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique) pendant le SOL par rapport à l'éveil et au sommeil paradoxal au niveau du cortex (Vanini et al., 2012), ainsi qu'au niveau de l'aire préoptique ventrolatérale de l'hypothalamus (Révision par Samuels & Szabadi, 2008). Pendant le sommeil paradoxal, les neurones du noyau tegmental sublatérodorsal, neurones glutamatergiques, sont activés et engendrent une atonie musculaire (Révision par Luppi et al., 2011). Enfin, une activation progressive du système réticulaire ascendant met fin au stade de sommeil paradoxal engendrant ainsi l'éveil.

Le thalamus joue également un rôle très important dans le contrôle de la décharge des neurones corticaux responsables des différents états de vigilance (Révision par Llinás & Steriade, 2006), ceci dépendant du taux de dépolarisation neuronale. Pendant le SOL, les ondes delta caractérisant la synchronisation du système thalamocortical préviennent la transmission d'informations sensorielles vers le cortex, maintenant le système au repos (Révision par Steriade, 2000). Pendant l'éveil, les différents neurotransmetteurs tels l'acétylcholine, la noradrénaline, le glutamate, la dopamine et plusieurs autres sont responsables de l'activation neuronale et empêchent l'apparition d'activité à ondes lentes (AOL ou *slow wave activity*; SWA) également connue sous le nom d'activité delta (McCarley et al., 2007; Bernston et al., 2002).

#### **1.4 Synchronie neuronale du sommeil à ondes lentes**

Le SOL est caractérisé par l'AOL, dont la fréquence se situe entre 1 et 4 Hz. L'AOL émane des oscillations dans le potentiel membranaire neuronal générées par les cellules corticales et

synchronisées par les connexions cortico-corticales (Steriade, 2003). Ainsi, le cortex semble avoir une importance particulière dans la génération des ondes lentes. Les oscillations lentes ont une phase de dépolarisation, pendant laquelle les neurones ont de fortes décharges, suivie par une phase d'hyperpolarisation pendant laquelle les neurones sont silencieux (Steriade et al. 1993).

Comme déjà mentionné, les conséquences d'un manque de sommeil sont très nombreuses et néfastes pour l'organisme. Par contre, les mécanismes sous-jacents aux effets observés demeurent moins bien compris. Ainsi, différents modèles ont été élaborés afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation du sommeil, tels des modèles mathématiques (Rempe et al., 2010). Un des modèles les plus utilisés est le modèle de régulation du sommeil à deux processus, proposé par Borbély et Daan dans les années 1980 (Borbély, 1982; Daan et al., 1984). Ces deux processus sont les processus homéostatique et circadien qui seront expliqués plus en détail ci-après.

## **1.5 Le modèle de régulation du sommeil à 2 processus**

### *1.5.1 Le processus homéostatique de régulation du sommeil*

Dans le modèle de régulation du sommeil à 2 processus, les ondes lentes représentent un indice de l'accumulation de la pression pour dormir : ce phénomène est défini comme étant le processus S ou processus homéostatique. En effet, la quantification des ondes lentes sur l'EEG d'un mammifère montre qu'une augmentation de la durée d'éveil engendre une

augmentation de l'AOL pendant l'épisode de SOL subséquent. Par la suite, l'AOL diminue avec le temps de sommeil. Ceci signifie donc que plus la période d'éveil est longue, plus le sommeil subséquent sera intense. Afin d'établir ce principe d'augmentation de l'AOL en fonction de la durée de l'éveil, de nombreuses études de privation de sommeil ont été réalisées autant chez l'humain (Dijk et al., 1993) que chez l'animal. Un modèle du processus S est représenté dans la figure 1 ci-dessous (Jenni et al., 2005). Cette étude réalisée chez l'humain montre qu'une augmentation de la pression pour dormir (flèche rouge) est suivie par une augmentation de l'AOL pendant l'épisode de SOL suivant (détectée par les points sur le graphique), qui se dissipent par la suite pendant le sommeil (flèche bleue). Un exemple chez l'animal est l'étude réalisée par Irene Tobler en 1986, qui montre qu'une privation de sommeil réalisée chez les rats est suivie par une augmentation de l'activité delta durant l'épisode de sommeil qui suit (Tobler & Borbély, 1986). De plus, non seulement l'AOL quantifiée par l'analyse spectrale, mais également l'amplitude ainsi que la fréquence des ondes lentes individuelles est élevée au début d'un épisode de sommeil (Bersagliere & Achermann, 2010; Mongrain et al., 2011b).

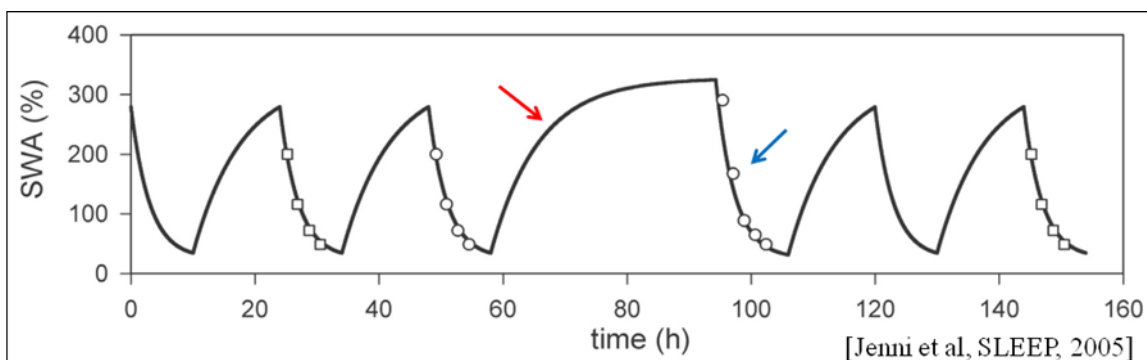




Figure 1 : Représentation du pourcentage de l'activité à ondes lentes (SWA) en fonction du temps dans une simulation réalisée chez des sujets adolescents. Une augmentation de la pression pour dormir pendant l'éveil engendre une augmentation de d'AOL (SWA) dans l'épisode de sommeil subséquent (points). Flèche rouge : pression pour le sommeil qui augmente pendant une période d'éveil prolongée, flèche bleue : pression pour le sommeil qui diminue avec le temps passé endormi (figure modifiée de Jenni et al., 2005).

Il existe d'autres marqueurs du processus S tels l'activité thêta (4-8 Hz) à l'éveil qui augmente pendant un éveil prolongé en parallèle avec l'augmentation d'AOL observée pendant l'épisode de sommeil subséquent (Finelli et al., 2000). D'autres marqueurs moléculaires sont aussi impliqués dans le processus S, tels les marqueurs encodés par les gènes de plasticité. Ceci est le cas de BDNF, dont l'expression augmente suite à une privation de sommeil (Hairston et al., 2004), et dont l'administration résulte en une augmentation d'AOL pendant le sommeil subséquent (Faraguna et al., 2008). De plus, une étude réalisée chez la souris montre que le degré d'exploration de l'environnement détermine le taux de synthèse de BDNF ainsi que l'intensité des ondes lentes pendant l'épisode de sommeil subséquent. En effet, les résultats montrent que le degré d'exploration est corrélé avec la quantité de *Bdnf* dans le cortex cérébral (Huber et al., 2007). D'autres marqueurs moléculaires du processus S comprennent aussi Arc et Fos (Cirelli & Tononi, 2000a; Révision par Cirelli & Tononi, 2000b; Guzowski et al., 2001). Ces différents marqueurs ont été utilisés dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents au processus S. Or, jusqu'à date, on ne connaît toujours pas la source exacte du processus S qui semble plutôt dépendre de l'activité neuronale elle-même.

### 1.5.2 Le processus circadien de régulation du sommeil

Le deuxième processus du modèle de régulation du sommeil est le processus circadien ou C. La propension pour le sommeil est régulée selon un rythme circadien (environ 24 heures) par une horloge interne localisée dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus chez les mammifères. Le rôle de cette horloge, contrôlée par des gènes nommés 'gènes de l'horloge', est de faciliter le sommeil au bon moment de la journée, ce qui dépend de l'espèce. Chez les mammifères, les gènes de l'horloge principaux sont *Clock*, *Bmal1*, *Cryptochrome1* et -2 (*Cry1* et -2) et *Period1* et -2 (*Per1* et -2) ainsi que *NPAS2*, dont l'expression varie selon le temps du jour (Lincoln et al., 2002; Révision par Hastings & Herzog, 2004). Ceci est réalisé grâce au fait que l'expression de ces gènes est régulée par une boucle de rétroaction négative. En résumé, CLOCK et BMAL1, qui sont des facteurs de transcription, activent la transcription des gènes *Cry1* et -2 ainsi que *Per1* et -2 dont les produits protéiques répriment leur propre expression en inhibant le complexe formé par CLOCK et BMAL1 (Allada et al., 1998; Darlington et al., 1998; Sangoram et al., 1998; Kume et al., 1999).

Ensemble, les processus circadien et homéostatique déterminent la consolidation ainsi que la qualité de l'éveil et du sommeil (Dijk & Czeisler, 1994; 1995). Ceci est réalisé à travers une relation temporelle adéquate entre les deux, qui est essentielle au bon fonctionnement du système. En effet, pendant que la tendance homéostatique pour dormir augmente au fur et à mesure que l'éveil avance, l'horloge biologique promeut l'éveil jusqu'à une heure avancée

de la journée, tandis que pendant le sommeil, la pression homéostatique pour dormir diminue et l'horloge biologique promeut le sommeil jusqu'au début de la journée.

### *1.5.3 Le rôle des gènes de l'horloge dans la régulation homéostatique du sommeil*

Or, les gènes de l'horloge ne semblent pas avoir uniquement un rôle dans la régulation du processus circadien, mais semblent aussi être impliqués dans la régulation homéostatique du sommeil, et ce indépendamment de l'effet circadien (Mongrain & Franken, *accepté*). Effectivement, comme mentionné plus haut (section 1.5.1), le processus S n'est pas uniquement mesuré par l'AOL mais il existe aussi des marqueurs moléculaires de l'homéostasie du sommeil. Ceci est l'exemple de *Homer1a*, un gène dont l'expression augmente avec la durée de l'éveil (Maret et al., 2007; Naidoo et al., 2012). Concernant les gènes de l'horloge, leur implication dans le processus homéostatique est supportée par deux évidences : la première est que l'expression de plusieurs gènes de l'horloge est affectée par la privation de sommeil. En effet, on observe une augmentation de *Per1* et *Per2* chez des souris privées de sommeil par rapport au groupe contrôle (Wisor et al., 2002; Mongrain et al., 2010; Franken et al., 2007). La deuxième évidence est qu'une mutation dans un ou plusieurs gènes de l'horloge spécifiques change les marqueurs du processus S, et en particulier la dynamique de l'AOL (Franken et al., 2006). Ces résultats montrent un rôle possible des gènes de l'horloge dans la régulation du processus homéostatique du sommeil, mais les mécanismes exacts sont encore très mal définis.

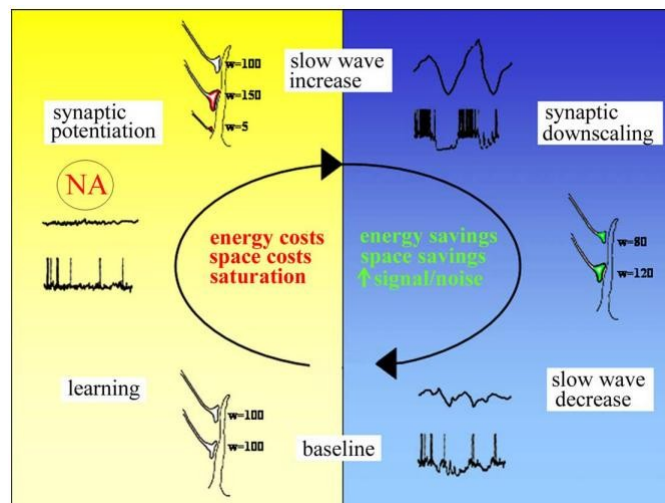
## **1.6 L'hypothèse de l'homéostasie synaptique**

Afin de définir le substrat de l'aspect récupérateur du sommeil, un groupe de chercheurs a proposé l'hypothèse de l'homéostasie synaptique (Fig. 2 ci-dessous; Tononi & Cirelli, 2006). Cette hypothèse suggère que pendant l'éveil, l'activité neuronale élevée permettrait la potentialisation des synapses existantes et la formation de nouvelles synapses. Cependant, il y a une limite d'énergie et d'espace qui causent une saturation de la capacité d'apprentissage, d'où le besoin de dormir. Ainsi, pendant le sommeil subséquent, le milieu neurochimique favoriserait des arrêts synchronisés de l'activité neuronale chez un ensemble de neurones. Toujours selon l'hypothèse, les ondes lentes joueraient donc un rôle important pendant le sommeil : elles seraient responsables de la diminution générale de la force des synapses, et ainsi, les connexions importantes formées pendant l'éveil resteraient présentes alors que les connexions moins importantes disparaîtraient afin de ramener le système à son équilibre initial. Cette diminution de la force synaptique réduirait ainsi la synchronisation de l'activité neuronale, ce qui engendrerait la diminution des ondes lentes au fur et à mesure qu'on avance dans le sommeil. Ceci ramènerait tout le système à un niveau de base, préparant le cerveau à recevoir de nouvelles informations le lendemain.

L'hypothèse de l'homéostasie synaptique est appuyée par le fait que plusieurs des marqueurs moléculaires du processus homéostatique, dont l'expression augmente suite à un éveil prolongé, sont aussi impliqués dans la potentialisation synaptique (ex, BDNF, Homer1a). L'expression de ces marqueurs a, en général, été associée à une modulation de la transmission synaptique (Sala et al., 2003 ; Fortin et al., 2012; Laudes et al., 2012; Rozov et

al., 2012; Waterhouse et al., 2012). De plus, la potentialisation à long terme induite par une augmentation de la force synaptique est due à une augmentation du taux de l'efficacité glutamatergique pendant l'éveil responsable de l'activation du cortex (Williams et al., 2007). Par exemple, la période d'éveil est accompagnée par une augmentation de l'activation des récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate (R-AMPA), récepteurs glutamatergiques dont l'expression diminue pendant le sommeil (Vyazovskiy et al., 2008).

Figure 2 : Représentation de l'hypothèse de l'homéostasie synaptique. Pendant la période d'éveil (jaune) certaines connexions synaptiques se renforcent et de nouvelles synapses associées à l'apprentissage et l'acquisition de nouvelles informations se forment, ceci est accompagné d'une sécrétion de neurotransmetteurs, tels la noradrénaline (NA), favorisant le stockage d'informations.



L'augmentation de la force synaptique résultant de la potentialisation à long terme coûte au système en énergie, et risque de le saturer. Suite à un éveil prolongé, l'activité à ondes lentes est élevée, ceci représentant l'augmentation de la pression pour dormir et découle d'une augmentation de la connectivité neuronale. Pendant la période de sommeil subséquent (bleu), il y a dépression synaptique générale afin de ramener le système à un niveau de base, accompagnée par une diminution de l'activité à onde lente (Tononi & Cirelli, 2006).

En résumé, l'hypothèse de l'homéostasie synaptique suggère que pendant l'éveil il y a une potentialisation synaptique qui est fonction du temps et de la qualité de l'éveil et qui engendre une augmentation des ondes lentes dans le sommeil qui suit. Au cours du sommeil, une dépression générale de la force synaptique permettrait de rétablir l'équilibre dans le système nerveux.

## **1.7 L'hypothèse de l'homéostasie synaptique contestée**

Bien que cette hypothèse soit appuyée par plusieurs données expérimentales, certaines évidences vont plutôt à l'encontre de celle-ci. Ces dernières ont récemment été adressées en détail par Dr Marcos Frank (Frank, 2012). Pour commencer, la plupart des évidences données afin de tester l'hypothèse de plasticité synaptique ont été réalisées par la même équipe de chercheurs qui a émit l'hypothèse, et ne se basent pas sur beaucoup d'autres expériences réalisées par d'autres équipes de recherche. Ceci est le cas de toutes les études référencées effectuées sur les insectes (Gilestro et al., 2009; Bushey et al., 2011; Donlea et al., 2011), les rongeurs (Vyazovskiy et al., 2008; Liu et al., 2010; Maret et al., 2011), ainsi que les humains (Huber et al., 2004).

De plus, les mécanismes par lesquels l'AOL est responsable de la dépression synaptique ne sont pas bien définis. En effet, Tononi décrit l'hypothèse d'homéostasie synaptique en disant que pendant l'éveil, l'interaction avec l'environnement favorise la potentialisation à long terme spécifique à la période d'éveil, et que les ondes lentes pendant le sommeil sont responsables de la dépression à long terme des synapses. Par contre, le moyen par lequel l'AOL est responsable de la dépression synaptique n'est pas expliqué, en indiquant uniquement que ces mécanismes sont probablement les mêmes que ceux qui sont impliqués dans la régulation de la dépression et de la potentialisation. Cette description générale du rôle de l'AOL dans la dépression synaptique peut être interprétée par des explications non liées au sommeil.

De plus, certains marqueurs moléculaires de la plasticité synaptique n'ont pas une expression augmentée suite à l'éveil. En effet, un éveil prolongé, tel que généré par une privation de sommeil, réduit l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la potentialisation à long terme, telles *Synaptoneurosomal-Associated Protein-25* (SNAP25) et Neurogranine (Neuner-Jehle et al., 1995; Basheer et al., 2005).

Selon l'hypothèse de Tononi, la potentialisation synaptique est associée à l'éveil alors que la dépression synaptique est associée au sommeil. Plusieurs études ont cependant montré que la potentialisation synaptique peut aussi avoir lieu pendant le sommeil. Il y a une augmentation de l'expression du gène de plasticité *zif268*, reliée à la potentialisation à long terme chez des rats dans le cortex et l'hippocampe pendant le sommeil paradoxal suite à leur exposition à un nouvel environnement (Ribeiro et al., 1999). De plus, un éveil prolongé nuit à la cognition et à la potentialisation à long terme. En effet, une privation de sommeil engendre une diminution de la potentialisation à long terme dans les cellules CA1 de l'hippocampe de rats (Campbell et al., 2002). Ces études ne sont pas en accord avec l'hypothèse de Tononi car elles montrent que les processus de potentialisation et de dépression à long terme ne sont pas restreints à l'éveil et au sommeil, respectivement, mais peuvent être retrouvés autant pendant l'éveil que pendant le sommeil.

Les R-NMDA sont associés à la plasticité neuronale et sont des médiateurs importants de la potentialisation à long terme. Ces derniers médient une transmission neuronale excitatrice et sont dérégulés pendant l'éveil. Étant donné leur rôle fondamental dans le fonctionnement

du cerveau et la cognition, un portrait plus détaillé de leur fonctionnement et de leurs liens avec l'éveil et le sommeil sera ici présenté.

## **1.8 Les récepteurs NMDA**

### *1.8.1 Le fonctionnement et les propriétés des récepteurs NMDA*

Les R-NMDA sont des récepteurs glutamatergiques ionotropiques dont l'activité est couplée à la présence des ions  $Mg^{2+}$  qui, en condition normale, empêchent le passage d'autres molécules comme les ions calciques. Lors de l'arrivée du signal, si le potentiel membranaire est atteint, le complexe R-NMDA –  $Mg^{2+}$  se dissocie, permettant aux ions calciques d'entrer dans la cellule, ceci créant une dépolarisation R-NMDA-dépendante (Révision par Dingledine et al., 1999). Dans les neurones corticaux, une augmentation du calcium intracellulaire conduit à une augmentation de la force synaptique excitatrice menant à une augmentation des décharges neuronales (Turrigiano, 2008) et ainsi la régulation de l'association avec différentes protéines d'échaffaudage. Ces dernières données supportent l'importance des R-NMDA dans la plasticité synaptique (Chen et al., 2006; Aton et al., 2009).

La plasticité synaptique régulée par les R-NMDA est due en grande partie à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire. En effet, les ions calciques n'ont pas pour rôle unique la dépolarisation cellulaire mais ils agissent aussi comme messagers seconds qui ciblent les molécules se trouvant dans le cytosol et/ou le noyau. Par exemple, le flux de calcium à l'intérieur de la cellule active, entre autres, une voie de signalisation impliquant



CREB, un facteur de transcription impliqué dans la plasticité à long terme, l'apprentissage et la mémoire (Révision par Kawamoto et al., 2012).

### *1.8.2 La composition et les ligands endogènes des récepteurs NMDA*

Un R-NMDA est constitué de 4 sous-unités. Or, il existe différentes sous-unités : 8 sous-types NR1, 4 sous-types NR2 et 2 sous-types NR3 (Dingledine et al., 1999; Carroll & Zukin, 2002). L'extrémité C-terminale des sous-unités qui se trouvent à l'intérieur de la cellule interagit avec différentes molécules d'échafaudage et est responsable de réguler la fonction du récepteur (Steigerwald et al., 2000). Le ligand activateur, qui est le glutamate, se lie à la sous-unité NR2 alors qu'un autre ligand, la glycine, qui est un co-agoniste des R-NMDA, se lie à la sous-unité NR1 afin d'activer le récepteur (Hirai et al., 1996; Laube et al., 1997). De plus, différentes études plus récentes ont été réalisées suggérant qu'une autre molécule, la D-sérine, pourrait être un deuxième co-agoniste endogène activant les R-NMDA (Mothet et al., 2000; Révision par Wolosker, 2007).

### *1.8.3 Récepteurs NMDA et manque de sommeil*

Étant donné le rôle important des R-NMDA dans la plasticité et la mémoire et l'importance du sommeil dans ces processus, plusieurs études ont visé à comprendre l'impact d'une privation de sommeil sur le fonctionnement des R-NMDA. Ainsi, Chen et al. (2006) ont observé qu'une privation de sommeil de 24 heures chez les souris induit une augmentation de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA dans le milieu intracellulaire dans l'hippocampe, suggérant une plus grande internalisation du récepteur et donc une diminution d'expression de R-NMDA à la surface cellulaire. De plus, les enregistrements de courants post-synaptiques

excitateurs de cellules granulaires de l'hippocampe ont montré une diminution du courant post-synaptique excitateur et une réduction de la potentialisation à long terme, ainsi qu'une altération au niveau de la mémoire spatiale chez les souris (Chen et al., 2006). Des résultats similaires furent aussi observés par d'autres équipes de recherche telles McDermott et son équipe (2006) après une privation de sommeil de 72 heures (augmentation de la présence des sous-unités NR1 et NR2A au niveau des cellules pyramidales CA1 de l'hippocampe de rats). Étant donné que la quantité totale de R-NMDA n'a pas été altérée, ces résultats suggèrent une diminution de l'expression des R-NMDA à la surface suite à une augmentation de la pression de sommeil (McDermott et al., 2006). Dans le but d'éliminer l'influence du stress sur les résultats observés, une troisième étude contrôlant pour le facteur stress que subissent les souris suite à une privation de sommeil a montré qu'une augmentation de la pression de sommeil diminue la potentialisation à long terme (Kopp et al., 2006). Ainsi, suite à une privation de sommeil, la fonction des R-NMDA ainsi que la plasticité liée à ces derniers diminue (Chen et al., 2006; Kopp et al., 2006; Aton et al., 2009). Ces observations permettent de conclure que l'activité des R-NMDA est altérée par un éveil prolongé.

#### *1.8.4 Les récepteurs NMDA et la synchronie corticale*

De plus, il semble que la contribution des R-NMDA au sommeil s'étend au contrôle de la capacité du cerveau à se synchroniser. En effet, l'activité des R-NMDA semble désynchroniser les réseaux neuronaux et induit l'éveil (Cape & Jones, 2000; Tegnér et al., 2002). En parallèle, une diminution de l'activité des R-NMDA semble permissive à la synchronisation du système, et la perte de conscience semble être associée à l'état de

sommeil (Tegnér et al., 2002; Wigren et al., 2007). Le fait que les anesthésiants agissent sur la fonction des R-NMDA supporterait le fait que les R-NMDA sont impliqués dans la perte de conscience associée au sommeil (Flohr, 1995).

L'ensemble de ces observations (la diminution des R-NMDA suite à un éveil prolongé aboutissant au sommeil et donc à la synchronisation du système) permet de proposer qu'une diminution de la transmission des R-NMDA pourrait être responsable de l'augmentation de la pression pour dormir après une période d'éveil prolongé (Mongrain & Franken, *accepté*). Ainsi, pendant l'éveil, une forte transmission glutamatergique engendrerait une diminution graduelle de la fonction des R-NMDA, préparant le système au prochain épisode de sommeil. Pendant le sommeil subséquent, la faible transmission glutamatergique permet la récupération de la fonction des R-NMDA essentiels à la dissipation du SOL, menant par la suite à l'éveil. Ainsi, les éléments qui contrôlent le fonctionnement des R-NMDA pourraient être impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil.

De plus, il est à noter que les propriétés des R-NMDA varient en fonction de la structure cérébrale et du type neuronal au niveau desquels ils se retrouvent. Par exemple, une étude réalisée par Kopp et collaborateurs montre que l'effet de la privation de sommeil sur l'hippocampe change la composition des R-NMDA, en augmentant le ratio NR2A/NR2B au niveau de la synapse (Kopp et al., 2006). Ces changements sont certainement spécifiques au tissu et l'implication des R-NMDA dans la synchronie neuronale pourrait survenir grâce à un

changement dans la composition des sous-unités du récepteur modifiant ainsi son fonctionnement.

## **1.9 Neuroligine 1**

### *1.9.1 La famille des Neuroligines*

Les Neuroligines (NLGN ou NLG) constituent une famille de molécules d'adhésion post-synaptique présentes en grande quantité dans le cerveau (Ichtchenko et al., 1996). En effet, des expériences d'hybridation in situ montrent que *Nlgn1*, 2 et 3 sont exprimées dans la plupart des populations neuronales chez des rats nouveau-nés ainsi que des rats adultes (Varoqueaux et al., 2006). Les NLGN sont des protéines transmembranaires de type1 (ancrées à la membrane lipidique et ayant un domaine transmembranaire). Elles constituent une famille de 4 gènes chez les rongeurs (*Nlgn1*, 2, 3 et 4; Ichtchenko et al., 1995; 1996; Bolliger et al., 2008) et 5 chez l'humain (*Nlgn1*, 2, 3, 4, 4Y; Bolliger et al., 2001; Jamain et al., 2003). Les NLGN interagissent physiquement avec d'autres molécules d'adhésion telles les  $\alpha$  et les  $\beta$ -Neurexines (NRX). Elles sont responsables du maintien d'une bonne connexion entre les synapses, et leur rôle exact dans le fonctionnement synaptique sera expliqué dans cette section.

Comme mentionné plus haut, le calcium joue aussi le rôle de messager second. Additionnellement, en plus d'être médiateur de plasticité synaptique, ce dernier est aussi un modulateur de la liaison NLGN1-NRX (Nguyen & Südhof, 1997). En réalisant des études de

chromatographie par affinité, ces auteurs ont trouvé que la liaison NLGN1-NRX augmente en fonction de la concentration d'ions calciques dans le milieu, et n'a pas lieu en leur absence (Nguyen & Südhof, 1997). Ces résultats soulignent l'importance du calcium dans la régulation des différentes protéines synaptique.

### *1.9.2 Les variants transcriptionnels de Neuroligine 1*

La première protéine de cette famille à être caractérisée est Neuroligine 1 (NLGN1), chez le rat (Ichtchenko et al., 1995). Comme son partenaire d'adhésion synaptique (NRX), NLGN1 subit un épissage alternatif pouvant générer plusieurs isoformes (Chih et al., 2006). Ces derniers sont caractérisés par la présence ou l'absence de deux inserts : l'insert A et l'insert B. On retrouve donc, dans le système nerveux central, un premier isoforme de NLGN1 contenant l'insert A et l'insert B (NLGN1AB), un deuxième isoforme ne contenant aucun des 2 inserts, un troisième isoforme contenant uniquement l'insert A (NLGN1A), et un quatrième isoforme contenant uniquement l'insert B (NLGN1B).

L'insert A, en absence d'insert B, semble responsable de cibler NLGN1 aux synapses de type inhibiteur (GABA), tandis que l'insert B est important pour le rôle sélectif de NLGN1 au synapses glutamatergiques (Chih et al., 2006). Ceci pourrait être dû à la structure carbohydate de l'insert B qui empêcherait NLGN1 d'induire la formation de synapses GABAergiques (Chih et al., 2006). Une autre équipe de recherche a aussi montré qu'une délétion de l'insert B engendre une augmentation anormale de nouvelles connexions synaptiques via le recrutement des protéines impliquées dans le relâchement de vésicules telles Bassoon et Synapsine (Lee et al., 2010). Aussi, cet isoforme recrute plus les  $\alpha$ -NRX par

rapport aux autres isoformes (Boucard et al., 2005). Bien que ces différents isoformes semblent déterminer le fonctionnement et le rôle de NLGN1, les études qui en parlent sont assez limitées (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Lee et al., 2010) et la majorité des travaux ne considèrent pas les différents inserts (Blundell et al., 2010; Suzuki et al., 2012), ceci étant probablement dû au fait qu'il n'existe actuellement pas d'anticorps spécifiques aux inserts.

### *1.9.3 Répartition de Neuroligine 1 et domaines protéiques*

NLGN1 est exprimée partout dans le cerveau mais elle est surtout retrouvée au niveau du cortex ainsi que de l'hippocampe (Song et al., 1999; *Allen Institute for brain science, mouse brain atlas*). Elle est impliquée dans le contact entre les synapses (Song et al., 1999), et plusieurs études ont tenté de déterminer son rôle exact au niveau synaptique. Pour ce faire, il est important de connaître la fonction de quelques domaines qui la caractérisent : 1) l'extrémité N-terminale qui se retrouve dans la fente synaptique contient un domaine acétylcholinestérase non fonctionnel (NLGN1 n'a donc pas d'activité catalytique dans l'hydrolyse de l'acétylcholine) permettant la formation de liens disulfures et donnant à la protéine une structure tertiaire, 2) un domaine transmembranaire permettant l'ancrage de NLGN1 dans la membrane post-synaptique et 3) un motif intracellulaire PDZ à l'extrémité C-terminale qui permet la liaison avec des partenaires telle la protéine PSD-95 .

### *1.9.4 Le rôle de Neuroligine 1 dans la maturation synaptique*

Initialement, un rôle de NLGN1 dans la synaptogenèse a été proposé (Scheiffele et al., 2000; Graf et al., 2004). En effet, lors d'expériences *in vitro*, NLGN1 induisait la formation de

synapses dans des cellules non-neuronales (Scheiffele et al., 2000; Nam & Chen, 2005). Un modèle de la formation initiale du contact synaptique régulé par NLGN1 et NRX est représenté par Chen et al., 2010 (voir Fig. 3 ci-dessous). Cependant, plus récemment, des expériences d'enregistrement électrophysiologique de neurones corticaux montrent qu'une surexpression de NLGN1 engendre une augmentation du nombre de synapses excitatrices mais pas la formation de nouvelles synapses (Schnell et al., 2012). NLGN1 est donc importante pour la maturation et le bon fonctionnement synaptique mais pas nécessairement pour l'établissement du contact initial entre les synapses (voir aussi Varoqueaux et al. pour l'étude d'un modèle triple KO (*Knockout*) de NLGN; Varoqueaux et al., 2006 qui ne révèle pas de changement dans le nombre de synapses chez les KO).

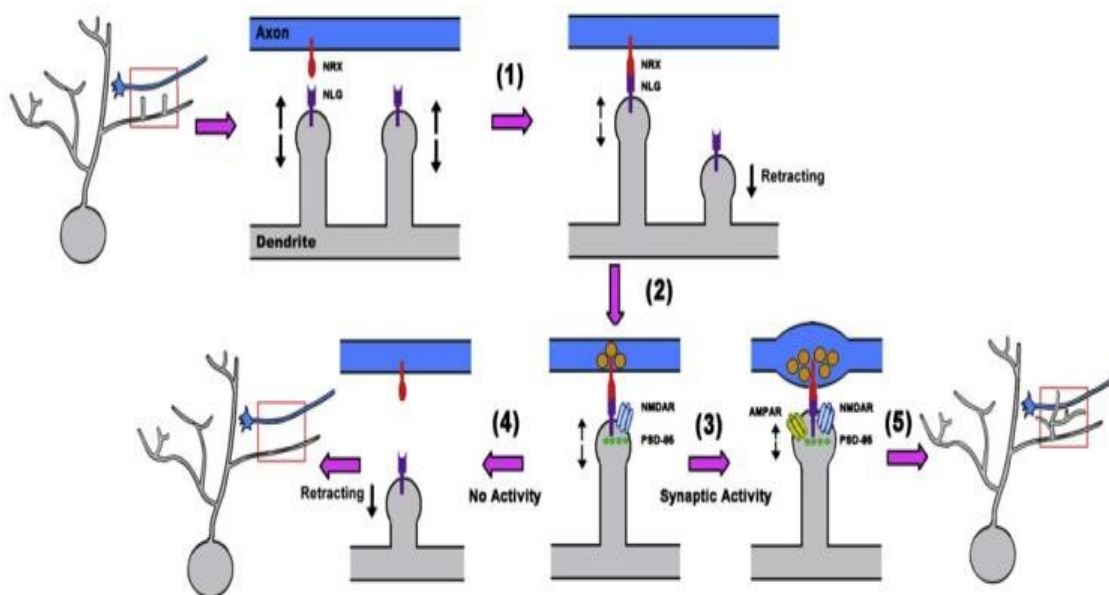


Figure 3 : Modèle de l'implication de NLGN1-NRX lors de la synaptogenèse, qui régule la stabilisation de filopodes dendritiques en plusieurs étapes : (1) Lors de la formation d'un nouveau contact axone-dendrite, NRX et NLGN1 créent des adhésions qui stabilisent la

membrane afin d'empêcher la rétraction des filopodes, (2) La liaison NLGN1-NRX engendre le recrutement de différentes protéines post-synaptiques, incluant PSD-95 et les R-NMDA, à travers son domaine PDZ intracellulaire, (3) les filopodes recevant une forte transmission neuronale se stabilisent, (4) les filopodes ne recevant pas suffisamment de signal se désassemblent, (5) la maturation synaptique engendre une stabilisation locale du cytosquelette, ce qui permet plus d'élongation (Chen et al., 2010).

#### *1.9.5 Le rôle de NLGN1 dans la transmission glutamatergique et autres effets sur le cerveau*

NLGN1 est présente majoritairement au niveau de la membrane post-synaptique des synapses excitatrices ou inhibitrices (localisation de NLGN1 au niveau de la fente synaptique ainsi que de la densité post-synaptique en utilisant la microscopie électronique; Song et al., 1999), dépendant de l'insert présent. De plus, NLGN1 colocalise avec les R-NMDA et régule leur activité. Effectivement, une surexpression de *Nlgn1* engendre une augmentation du potentiel post-synaptique excitateur dépendant des R-NMDA (Dahlhaus et al., 2010) alors qu'on observe une diminution de la transmission synaptique contrôlée par les R-NMDA au niveau de l'amygdale chez les souris n'exprimant pas NLGN1. La mutation de *Nlgn1* engendre également une diminution de la potentialisation à long terme entre les connexions thalamus-amygdale mais pas aux connexions cortex-amygdale (Jung et al., 2010). Aussi, le potentiel post-synaptique excitateur associé aux R-NMDA diminue dans les neurones dans lesquels l'activité de NLGN1 est atténuée par rapport à des neurones contrôle (Kwon et al., 2012). De plus, les neurones n'exprimant pas NLGN1 ont moins de force de liaison avec les synapses avoisinantes et voient la stabilité de leur densité post-synaptique altérée (Zeidan & Ziv, 2012).



Une mutation triple de *Nlgn1*, 2 et 3 est létale chez la souris (Varoqueaux et al., 2006). Cependant, les souris mutantes pour *Nlgn1* uniquement sont viables et n'ont pas de déficits majeurs (Varoqueaux et al., 2006). Ainsi, plusieurs équipes de recherche ont pu étudier l'effet d'une mutation de *Nlgn1* sur la mémoire, la cognition ainsi que sur le comportement. Les souris mutantes pour *Nlgn1*, qui n'expriment donc pas la protéine, ont des troubles de mémoire (diminution de la mémoire spatiale; Blundell et al., 2010). Aussi, une absence de NLGN1 engendre non seulement un déficit au niveau de la mémoire de conditionnement à la peur, mais aussi un déficit de la transmission glutamatergique, représenté par une diminution du courant médié par les R-NMDA ainsi que l'arrêt de l'induction de potentialisation à long terme (Kim et al., 2008).

Les différents effets d'une diminution ou d'une absence d'expression de NLGN1 observés, tels des déficits au niveau de la mémoire (Blundell et al., 2010), une diminution de la transmission NMDA (Kim et al., 2008) et des altérations de la potentialisation à long terme (Jung et al., 2010) soulignent un rôle de NLGN1 dans la plasticité synaptique. De plus, ces effets apparaissent similaires à ceux engendrés par le manque de sommeil.

## **Chapitre 2 : OBJECTIFS, Hypothèses et contribution spécifique**

Étant donné que les R-NMDA sont importants dans la plasticité synaptique (Chen et al., 2006), que leur activation engendre une désynchronie corticale (Golomb et al., 2006), que leur expression à la surface cellulaire est réduite suite à une privation de sommeil (Chen et al., 2006), que leur activité est contrôlée par NLGN1 (Jung et al., 2010), et que l'absence de NLGN1 produit des effets similaires à ceux d'un manque de sommeil (Blundell al., 2010; Binder et al., 2012), nous avons voulu étudier le rôle de NLGN1 dans la régulation du sommeil. Le but principal de la présente étude est donc de démontrer que NLGN1 est impliquée dans le processus homéostatique de régulation du sommeil.

### *2.1 Objectifs*

Afin de répondre à cette question, trois objectifs spécifiques ont été émis : 1) Mesurer l'effet de la durée de l'éveil sur la quantité de *Nlgn1* ainsi que de NLGN1, 2) Déterminer la contribution de NLGN1 à la macrostructure du sommeil ainsi qu'à sa composition spectrale, 3) Étudier l'implication des gènes de l'horloge dans la régulation de l'expression de *Nlgn1*.

### *2.2 Hypothèses*

Les hypothèses émises en lien avec chaque objectif sont : 1) L'expression de *Nlgn1* ainsi que la quantité synaptique de NLGN1 seront diminués par une privation de sommeil par rapport au sommeil de souris contrôle, 2) Les souris n'exprimant pas NLGN1 auront un sommeil plus

profond que les souris normales, 3) Le lien entre NLGN1-gènes de l'horloge sera altéré suite à une privation de sommeil.

### *2.3 Contribution spécifique de l'auteur principal*

Mon projet de maîtrise portait sur les deux premières hypothèses. J'ai été la personne principale dans la rédaction de l'article et j'ai discuté de tous les résultats obtenus. Mais mon projet de maîtrise se concentrait sur l'effet d'une augmentation de la pression de sommeil sur NLGN1 (Fig. 2 et Fig. S1A) ainsi que l'effet d'une mutation au niveau de *Nlgn1* sur la composition du sommeil des souris (Fig. 3). Je vais donc discuter principalement de mes résultats dans la discussion de mon mémoire qui suit.

### **Préambule au Chapitre 3 - Contribution des co-auteurs à l'article :**

Érika Bélanger-Nelson a participé à la réalisation de plusieurs expériences et à l'analyse de ces mêmes données (expression de l'ARNm de *Neurologine 1 (Nlgn1)* [Fig. 1B, 1C, 4A], chirurgies d'implantation et les analyses de sommeil [Fig. 3], expression des gènes de plasticité [Fig. 3F], imagerie optique mutlispectrale [Fig. S1D et S1E]). Elle a aussi participé à la rédaction du manuscrit.

Marlène Freyburger a participé à la réalisation et à l'analyse des données de plusieurs expériences (imagerie optique mutlispectrale [Fig. S1D et S1E] et tests d'interaction sociale [Fig. S1C]). Elle a participé à la rédaction de la méthodologie correspondante à ces expériences (matériel SI).

Stéphane Dorsaz a participé à la réalisation des expériences des Fig. 1B et 4A, Thomas Curie a participé aux expériences des Fig. 1B, 1C, 4A, 4C et 4D; et Fransesco La Spada a participé aux expériences des Fig. 4C et 4D. Ils ont participé à la rédaction des méthodologies correspondantes.

Pierre-Olivier Gaudreault a construit le montage expérimental et mis en place le protocole du test NSS (Fig. S1B) et a participé à la rédaction de la méthodologie correspondante (matériel SI).

Éric Beaumont a participé à la mise sur pied des expériences d'imagerie optique mutlispectrale (Fig. S1D et S1E). Frédéric Lesage a participé à la mise sur pied et à l'analyse des expériences d'imagerie optique mutlispectrale (Fig. S1D et S1E) ainsi à la rédaction de la méthodologie correspondante (matériel SI). Philippe Pouliot a participé à l'analyse des expériences d'imagerie optique mutlispectrale (Fig. S1D et S1E) et à la rédaction de la méthodologie correspondante (matériel SI).

Paul Franken et Marcos Frank ont contribué à l'établissement des hypothèses de recherche, à l'organisation des expériences et à la rédaction du manuscrit. Marcos Frank a fourni le protocole d'extraction synaptoneurosomale (Fig. 2). Paul Franken a contribué à défrayer les coûts des réactifs (Fig. 1B, 1C, 4A, 4C, 4D).

Valérie Mongrain a généré les hypothèses de recherche, a supervisé l'organisation des expériences et a rédigé le manuscrit. Elle a aussi participé à la réalisation de plusieurs expériences et à l'analyse de ces mêmes données (Fig. 1B, 1C, 3, 4). Elle a contribué à défrayer les coûts des réactifs (Fig. 1B, 1C, 2, 3, 4A).

**Chapitre 3 : Méthodologies et Résultats – Article de recherche**

**Neuroigin-1: a Link between Neuronal Activity  
and Sleep/Wake Regulation**

Article soumis à *< Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
America >*

# **Neuroigin-1: a Link between Neuronal Activity and Sleep/Wake Regulation**

Janine EL HELOU<sup>1,2</sup>, Erika BÉLANGER-NELSON<sup>2</sup>, Marlène FREYBURGER<sup>2</sup>, Stéphane DORSAZ<sup>3</sup>, Thomas CURIE<sup>3</sup>, Francesco LA SPADA<sup>3</sup>, Pierre-Olivier GAUDREAU<sup>2</sup>, Éric BEAUMONT<sup>4</sup>, Philippe POULIOT<sup>5</sup>, Frédéric LESAGE<sup>5</sup>, Marcos FRANK<sup>6</sup>, Paul FRANKEN<sup>3</sup>,  
Valérie MONGRAIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychiatry, Université de Montréal, QC, Canada; <sup>2</sup>Center for Advanced Research in Sleep Medicine and Biomedicine Center, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, QC, Canada; <sup>3</sup>Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Vaud, Switzerland; <sup>4</sup>Department of Biomedical Sciences, East Tennessee State University, TN, USA; <sup>5</sup>Department of Electrical Engineering, École Polytechnique de Montréal and Research Center, Montreal Heart Institute, QC, Canada; <sup>6</sup>Department of Neuroscience, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, PA, USA.

Submitted for publication to: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*

Content: 18 pages, 4 figures, 1 supporting information file and 1 supporting figure

Correspondence to be addressed to:

Valerie Mongrain, PhD

Centre for Advanced Research in Sleep Medicine

Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

5400 Gouin West Blvd

Montreal, QC, Canada, H4J1C5

Phone: 514-338-2222 ext. 3323

Conflict of interest: none

Funding sources: Canadian Institutes of Health Research, Fonds de la recherche du Québec - Santé, Université de Lausanne, Research Center of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal



## ABSTRACT

Maintaining wakefulness depends on the extent and quality of neuronal activity but is associated with a progressive increase in the need for sleep. This phenomenon has been linked to changes in synaptic function. In particular, N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) functioning is impaired by prolonged wakefulness, which may underlie both the deleterious effects of sleep loss on cognition and subsequent changes in cortical synchrony. NMDAR are regulated by, among others, the synaptic adhesion molecule Neuroligin-1 (NLG1) that controls their activity and synaptic localization. We here highlight a role for NLG1 in the regulation of sleep/wake duration and quality using a combination of molecular and electrophysiological techniques. First, we observed using qPCR that the expression of specific *Nlg1* transcript variants is changed by sleep deprivation in various inbred mouse strains. These observations were also associated with strain-specific changes in the synaptic NLG1 protein content. Importantly, we showed that *Nlg1* knockout mice are not able to sustain wakefulness and spent more time in non-rapid eye movement (NREM) sleep than wild-type mice. These changes occurred with modifications in waking quality as exemplified by low theta/alpha activity during wakefulness and poor preference for social novelty, as well as altered delta synchrony during sleep. Lastly, we identified a transcriptional pathway that could underlie the sleep/wake-dependent changes in *Nlg1* expression and that involves clock

transcription factors, which bind to the *Nlg1* gene as a function of sleep need. We thus suggest that NLG1 is an element that contributes to the coupling of neuronal activity to sleep/wake regulation.

**KEYWORDS:** synaptic plasticity, sleep/wake regulation, gene expression, EEG, CHIP

## \body **INTRODUCTION**

Sleep is crucial for learning and memory, and many other functions essential to proper functioning of the brain and body (1,2). These functions have been associated with the recovery process underlying sleep regulation, which defines a level of pressure for sleep that increases with wakefulness and dissipates during sleep, and that is reflected by changes in sleep intensity (3,4). Sleep intensity is indexed by electroencephalographic (EEG) markers of neuronal synchrony in delta frequencies (1-4Hz) measured during non-rapid eye movement (NREM) sleep (5). During wakefulness, mechanisms favoring desynchrony in the delta range predominate and the brain can maintain cognition whereas during sleep, events promoting network synchrony are mostly taking place with high delta thought to be permissive of recovery (3,6). The sleep recovery process has been hypothesized to originate and contribute to the maintenance of both synaptic and network equilibrium (6-8). This notion is supported by several lines of evidence including the observation that specific plasticity-related genes may be directly involved in regulating sleep need (9). Certain clock genes may also directly contribute, in a circadian-independent manner, to the sleep recovery process (5,9). However, the mechanisms underlying the capacity and requirement of the brain to switch from an alert desynchronized state to an unconscious synchronized state remain elusive.

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter of the brain, can induce long-term modifications of synaptic transmission, and thus major changes in network connectivity. This

is achieved mainly through its action on two types of receptors: N-methyl-D-aspartate and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionate (NMDAR and AMPAR) (10,11). The fine balance between the activity of these receptors was proposed to determine neuronal firing synchrony (12,13), with high NMDAR activity associated to desynchrony reminiscent of active wakefulness, and low NMDAR/high AMPAR activity linked to synchrony, similar to what is observed during intense NREM sleep (14). Also, prolonged wakefulness achieved by sleep deprivation (SD), which triggers intense sleep, decreases NMDAR function and NMDAR-dependent forms of plasticity (15-17). It can thus be hypothesized that high glutamate transmission during wakefulness and REM sleep (18) gradually desensitizes NMDAR and changes the balance in favor of AMPAR transmission, which would lead to high cortical synchrony during NREM sleep. During NREM sleep, lowered glutamate transmission (18) may help recover NMDAR function, which would gradually dissipate high neuronal synchrony/sleep intensity. In this scenario, elements regulating NMDAR functioning are of unique relevance to the sleep recovery process.

Neurologin-1 (NLG1) is a post-synaptic adhesion molecule localized at excitatory glutamatergic and inhibitory GABAergic synapses with a prominent preference for the former (19,20). At glutamatergic synapses, NLG1 determines the number of functional NMDAR (21-23), and is required for normal expression of NMDAR-dependent plasticity (23,24).

Moreover, the synaptic level of NLG1 is downregulated by neuronal activity (25), and its absence impairs spatial and associative fear memory (24,26) in a way similar to SD. Therefore, through its response to neuronal activity and role in regulating glutamate

transmission, NLG1 is a potent candidate to modulate both the deleterious consequences of sleep loss and the sleep/wake-dependent changes in sleep intensity. We indeed found here that elevated sleep pressure changes the gene expression and synaptic level of NLG1. Furthermore, we identified a transcriptional pathway that likely contributes to these changes and that belong to the circadian-independent role of core clock transcription factors in sleep regulation (5). Also, using EEG recording in mice lacking NLG1, we observed that NLG1 is required to maintain normal wakefulness duration and quality, which reveals a role for NLG1 in sleep/wake regulation.

## RESULTS

### ***Nlg1* expression in the mouse brain is changed by sleep deprivation**

A role for NLG1 in the sleep recovery process may imply that its expression or activity would track wakefulness duration. Thus, we measured the effect of SD on the expression of *Nlg1* in two inbred mouse strains, C57BL/6J (B6) and AKR/J (AK), showing different degrees of delta power rebound following increased sleep need (27). This was quantified for different *Nlg1* transcript variants because these variants were shown to change NLG1 properties (28). We used 5 probes targeting: 1) the insert in splice site A, 2) the absence of insert in splice site A, 3) the insert in splice site B, 4) the absence of insert in splice site B, and 5) a sequence common to all variants (Fig. 1A). We observed that a 6h SD starting at light onset decreased

the forebrain expression of *Nlg1* containing insert B in the two strains (Fig. 1B). This significant SD-dependent decrease was also observed at the level of the common probe. In addition, in AK mice only, the expression of *Nlg1* containing insert A was significantly increased by SD (Fig. 1B).

To verify that the SD-dependent changes in the expression of *Nlg1* transcripts was not due to the SD-associated surge in corticosterone, which importantly contributes to the SD-induced changes in brain transcriptome (9), the expression was also measured in the mouse strain showing the larger surge in corticosterone with SD (9), DBA/2J (D2) mice, submitted to adrenalectomy (ADX) or sham lesion. We observed that in both ADX and sham mice, and similar to B6 and AK mice, SD significantly decreased the expression of *Nlg1* with insert B and of the common probe (Fig. 1C). Moreover, a SD-dependent decrease in *Nlg1* without insert A was found for ADX and sham D2 mice (Fig. 1C). These results indicate that elevated sleep pressure decreases the expression of *Nlg1* containing an insert B (and likely no insert A) in various mouse strains, and that this effect is independent from the surge in corticosterone associated with SD.

### **NLG1 level at the synapse is modified by sleep deprivation**

As changes in mRNA expression do not necessarily translate into changes in protein levels (29), we assessed the effect of a 6h SD on the forebrain expression of total and synaptoneurosomal (SN) NLG1 protein content in B6 and AK mice. In both strains, SD did not

affect the total NLG1 level in forebrain areas anterior or posterior to the bregma, neither the SN level in posterior forebrain (Fig. 2B and D). However, in the anterior forebrain, SD significantly decreased SN NLG1 levels in B6 mice (Fig. 2A and B) while, in contrast, SD increased SN NLG1 in AK mice (Fig. 2C and D). The antibody used recognizes the N-terminal part of NLG1 which precedes both splice sites, and therefore, does not discriminate between NLG1 isoforms. However, the SD-dependent decrease in anterior SN NLG1 in B6 is reminiscent of the effect of SD on the amplicon targeting *Nlg1* with insert B (Fig. 1B), whereas the SN NLG1 increase following SD in AK could be linked to the increase observed for *Nlg1* with insert A, which was specific to this strain (Fig. 1B). In sum, these data suggest that elevated sleep pressure modulates synaptic NLG1 level in a brain area- and strain-specific fashion.

### **The absence of NLG1 decreases wakefulness duration**

Due to the sleep/wake-dependent changes observed in *Nlg1* expression and protein level in the mouse brain, we aimed to verify if the absence of NLG1 affects sleep/wake regulation. Hence, the 24h time course of vigilance states during undisturbed condition was measured in *Nlg1* knockout (KO) mice. NLG1 protein (all isoforms) is undetectable in these mice (Fig. S1A) generated by replacing coding exon 1 and 2 by a neo cassette (30). The lack of NLG1 decreased the duration of wakefulness and increased the duration of NREM sleep by more than an hour when analyzing the full 24h (Fig. 3A). When considering the 12h light (rest) and 12h dark (active) period separately, we observed that these differences were restricted to

the dark period (Fig. 3A). Furthermore, looking at the time course of sleep/wake states per hour revealed that *Nlg1* KO mice spent more time in NREM and rapid eye movement (REM) sleep during the first two thirds of the dark period when WT mice are usually awake (Fig. 3B), and less time asleep in the last third of the dark period, when WT mice are usually 'napping'. Since KO mice seemed to show impairment in maintaining wakefulness during the active phase, we compared their mean duration of individual wake bouts to those of WT (Fig. 3C). Wake bout duration was 37.3% shorter in *Nlg1* KO than in WT mice during the 12h dark period. These data indicate that mice lacking NLG1 cannot sustain long bouts of wakefulness, which is accompanied by an overall decrease in wakefulness duration and increase in NREM sleep duration.

### **The absence of NLG1 modifies cortical synchrony during wakefulness and sleep**

In order to demonstrate that NLG1 is implicated in shaping neuronal synchrony during sleep/wake states, EEG power spectra were calculated for the 3 states. Mice lacking NLG1 showed a pronounced reduction, during wakefulness, of high delta/low theta and alpha activity (3.25-5.75Hz, 8.25-10.5Hz; Fig. 3D). Conversely, during NREM sleep, *Nlg1* KO showed a trend ( $p < 0.1$ ) for higher spectral power in the delta and sigma frequency ranges (1.75-3Hz, 13.75-16Hz; Fig. 3D), both previously linked to the sleep recovery process (31,32). The analysis of the time course of NREM sleep delta activity (1-4Hz) confirmed this (Fig. 3E); *Nlg1* KO mice showed generally higher levels of delta and this difference was most pronounced at the beginning of the light period and the end of the dark period, when sleep pressure is



usually highest (27). Conversely, EEG activity during REM sleep was unaffected by the *Nlg1* mutation (Fig. 3D). These data show that NLG1 is required to maintain normal synchrony of cerebral cortex activity during wakefulness and NREM sleep.

### **Effect of NLG1 absence on molecular markers of sleep need and on correlates of plasticity**

To investigate if *Nlg1* KO mice express alterations in molecular markers of prolonged wakefulness, we measured, in the forebrain after SD, the expression of genes that have been associated with the sleep recovery process (9,33-35). As shown in Fig. 3F, the SD-dependent increase in expression in WT was equally observed in *Nlg1* KO for the targets *Homer1a*, *Bdnf* and *Per2*, indicating that pathways involving these markers are not affected by the mutation.

To understand the functional impact of sleep/wake modifications in *Nlg1* KO, we assessed other quality indicators of the alert state. While neurological function was preserved in *Nlg1* KO (Fig. S1B), we found that KO mice failed to show preference for social novelty (Fig. S1C), similar to what was previously reported (26). In addition, we aimed to determine if sleep/wake modifications in *Nlg1* KO could be associated with changes in the cerebrovascular response to neuronal stimulation, which is known to depend on NMDAR transmission (36). The somatosensory cortex of *Nlg1* KO mice showed a 10% reduction in the number of responses to forepaw stimulation (Fig. S1D), as well as, compared to WT, reduced oxygenated hemoglobin 4 sec after stimulation (Fig. S1E). These findings indicate that NLG1 is

likely a key modulator of the relationship between waking duration, waking quality, and the response to neuronal activity.

### ***Nlg1* expression depends on time-of-day**

If *Nlg1* has a role in the regulation of sleep and wakefulness, its expression should, in addition to being modulated by SD, vary with time-of-day as a function of the sleep/wake distribution. We indeed found that, in B6 and AK mice forebrain, the expression of *Nlg1* containing insert B was significantly higher at ZT6 (Zeitgeber time 6: 6h after light onset) than at other times of the day (Fig. 4A). The same was observed for the *Nlg1* common probe (Fig. S2). Time-of-day dependent expression of *Nlg1* could result from a circadian control. Clock genes have been involved in shaping the dynamics of neuronal synchrony during sleep (5). We thus examined the *Nlg1* gene, and noted the presence of several E-boxes (Fig. 4B), which are *cis*-regulatory elements serving transcriptional control by the core clock transcription factors CLOCK and BMAL1 (37). As some of these sequences are conserved across species, this suggests a role for transcription factors from the clock in regulating the rhythmic expression of *Nlg1*.

### **Time-of-day and sleep pressure regulate clock transcription factor binding to *Nlg1***

Because *Nlg1* expression depends on time-of-day and because its putative promoter contains E-boxes, we assessed if core clock transcription factors bind to its gene as a function of time-of-day and sleep need in the mouse cerebral cortex. We indeed observed that the binding of

BMAL1 and CLOCK to one E-box located 653 bp before *Nlg1* transcription start site varied with time-of-day (Fig. 4C), showing a peak at ZT6 and a trough around dark-light transition (ZT18-ZT0). This phase is similar to what we recently observed for the binding to several clock genes (38). Furthermore, and also similar to our recent data (38), we found that elevated sleep pressure decreases the binding of those transcription factors to the *Nlg1* E-box (Fig. 4D), although the effect did not reach statistical significance for BMAL1. In sum, these data support an implication of the clock molecular machinery in determining the strength of glutamatergic synapses via regulation of *Nlg1* expression.

## DISCUSSION

Our study highlights the involvement of *Nlg1* in bridging waking duration and quality to neuronal synchrony, and, as a consequence, suggests a role for this synaptic component in the regulation of wakefulness and sleep. We first showed that elevated sleep pressure determines the expression of specific *Nlg1* transcript variants as well as synaptic NLG1 protein content in the forebrain. Importantly, we uncovered that the absence of NLG1 alters sleep/wake state duration and EEG synchrony during wakefulness and NREM sleep. And finally, we found that core clock transcription factors are likely part of the mechanisms underlying the sleep/wake-dependent changes in *Nlg1* expression.

Previous work has shown that SD decreases the expression of several synaptic adhesion molecules (9,34), including *Nlg1* in the mouse cerebral cortex (39). The latter study (39) used an amplicon targeting all transcript variants although four different NLG1 isoforms are known to exist. Indeed, NLG1 can contain (or not) an insert in splice site A or B, which are both located in the extracellular cholinesterase domain of NLG1 (28). For the first time, we show that the effects of SD on NLG1 are isoform- and strain-dependent. Only in AK mice, SD increased the expression of *Nlg1* with insert A. Similarly, only in AK mice, synaptic NLG1 protein level was increased by SD (Fig. 2D). Our NLG1 antibody (20) targeted an epitope in close proximity to insert A with one overlapping amino-acid, which makes it possible for this antibody to preferentially identify NLG1 with insert A. AK mice have been shown to express the highest amount of sleep and a larger increase in EEG synchrony in response to SD (40), and our results suggest that sleep pressure differentially affects synaptic function in this strain. The presence of insert A does not affect the binding of NLG1 to its pre-synaptic partners neurexins (NRX) (28), but rather seems to target NLG1 to GABAergic synapses in the absence of insert B (19). Consequently, in AK mice, increased NLG1 with insert A may mediate changes in inhibitory GABAergic transmission with elevated sleep need that are not observed in other mouse strains. Alternative splicing of *Nlg1* may thus represent a pathway relevant to interindividual differences in the susceptibility to sleep loss.

Consistent with the changes observed for total *Nlg1* expression (39), we reliably observed that enforced wakefulness decreased the expression of *Nlg1* with insert B in three different inbred mouse strains. In addition, in B6 mice, synaptic NLG1 protein level was also decreased

by SD in the anterior forebrain, which could be more representative of NLG1 containing insert B given the absence of changes for the other transcript variants. Indeed, recent data indicate that neuronal activity decreases NLG1 level at the synapse (25,41), and our findings suggest that this decrease mainly concerns the isoform containing insert B. NLG1 with B, which expression in the brain prevails over isoforms lacking B (37), is mostly localized at glutamatergic synapses and is specifically implicated in the interaction with pre-synaptic NRX (19,28,42). Studies have shown that proper NMDAR function requires both the presence of NRX and NLG (21,43,44). Accordingly, decreased synaptic level of NLG1 with B following elevated sleep pressure may disrupt NLG1-NRX complexes and impair glutamatergic transmission. Alternatively, decreased synaptic NLG1 after SD might also represent a neuroprotective pathway against glutamate toxicity triggered by high neuronal activity since it was recently shown to negatively feedback on pre-synaptic neurotransmitter release by mean of NLG1 cleavage (25). We have proposed a role for sleep in neuroprotection as the expression of many transcripts involved in neuroprotection are reliably affected by sleep loss (9).

Furthermore, we established that the expression of *Nlg1* varied with time-of-the-day, again specifically for the insert B variant in both B6 and AK mice. A time-of-day- and sleep pressure-dependent expression likely involves regulation by clock genes, which have been shown to independently underlie both circadian and sleep recovery effects, and to act as modulators of synaptic function (5). We indeed found that: 1) the *Nlg1* gene contains E-boxes; 2) CLOCK and BMAL1 can bind to one of these E-boxes with maximum binding

observed during the main sleep episode; and 3) the binding of CLOCK and BMAL1 to *Nlg1* E-box is decreased by SD in the mouse cerebral cortex. These last two observations parallel changes in the expression of *Nlg1* with B, which provide support for a transcriptional control of *Nlg1* with insert B by core clock transcription factors. Hence, during enforced wakefulness, prolonged high neuronal activity could decrease CLOCK/BMAL1 binding to *Nlg1* E-boxes as it does for other CLOCK/BMAL1 targets (38). This, would then lead to reduced expression of *Nlg1* with B and NLG1 at the synapse, and consequently to impaired NMDAR function (Fig. 4E) and to high neuronal synchrony. Glutamate transmission has indeed been shown to induce BMAL1 degradation (45). During sleep, transcriptional activation by core clock transcription factors would restore the NLG1 pool at the synapse and eventually NMDAR function.

To further test the hypothesis of a role for NLG1 in sleep/wake regulation, we studied mice carrying a targeted deletion of *Nlg1*. *Nlg1* KO mice showed a decrease in the overall duration of wakefulness and in the mean duration of wake bouts in the active period. These findings provide support for a role of NLG1 in promoting and maintaining wakefulness. Reduced wake maintenance in *Nlg1* KO mice is reminiscent of the observation made in mice lacking *Homer1a* (46), which also regulates glutamatergic transmission. Although the SD-dependent increase in *Homer1a* expression was not affected by the *Nlg1* mutation, these observations suggest that NLG1 and HOMER1A could target similar molecular pathways in the regulation of wakefulness.

The absence of NLG1 did not only affect wake duration but also impaired wake quality. In fact, theta and alpha EEG activity during wakefulness was blunted in *Nlg1* KO mice, which also failed to respond to social novelty. Theta/low alpha activity during wakefulness is increased during active wakefulness, for instance during exploration, compared to quiet waking in rodents (47). These alterations in waking quality occurred simultaneously with a higher delta synchrony during NREM sleep, which was more prominent when sleep need is at its highest. Even if we cannot exclude, at this point, a developmental defect in arousal systems in the full-*Nlg1* KO studied here, these data strongly suggest that NLG1 is required to maintain wakefulness quality and normal synchrony of cerebral cortex activity during wakefulness and sleep. This is likely triggered by the ability of NLG1 to tune NMDAR function (21-24), which is also supported by our observation of reduced hemodynamic response to neuronal activation in *Nlg1* KO, a response involving NMDAR (36).

In sum, we here identify NLG1 as a part of a molecular pathway underlying the capacity of the brain to sustain the desynchronized alert state and to respond to its environment. Indeed, we reveal that the presence of NLG1 is required for normal cortical synchrony during both wakefulness and sleep. In addition, we identified a mechanism by which prolonged wakefulness could impair *Nlg1* expression, which involves core clock transcription factors. Since autism spectrum disorder was repeatedly linked to mutation in elements of the NRX-NLG system (48), our findings also suggest that dysfunctions in NLG1 or in other NRX-NLG elements could directly mediate the severe sleep alterations observed in autistic patients (49).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and Protocol**

Male mice used in this study were from four genetic backgrounds; C57BL/6J (B6), AKR/J (AK), DBA/2J (D2) and B6;129-*Nlgn1*<sup>*tm1Bros*</sup>/J (B6;129). Mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and studied directly (qPCR, Western blot) or after being bred on site (EEG, qPCR, CHIP). Mice were maintained under standard housing conditions (free access to food and water, 12h-light/12h-dark cycle, 22-25°C ambient temperature) for 2 weeks, and then studied in the same conditions between 8 and 16 weeks of age. Mice used for qPCR are from (50) (Fig. 1B), (9) (Fig. 1C), and (34) (Fig. 4A). Mice used for CHIP (Fig. 4C and D) are from (38). Sleep deprivation (SD) was performed during 6h from ZT0 to ZT6 (with ZT0 [Zeitgeber time 0] being the onset of the light period) by gentle handling (51). All sleep-deprived mice were sacrificed at ZT6 together with undisturbed (non-sleep deprived) control mice. For the ZT experiments (Fig. 4A and C), mice were sacrificed around the clock, at 6h intervals. Upon sacrifice, brains were immediately extracted and frozen on dry ice or liquid nitrogen.

### **Reverse Transcription, Quantitative PCR and Western blotting**



RNA extraction, reverse transcription and qPCR experiments and analysis were performed as detailed before (9,35,50). For *Nlg1* transcript variants, assays were designed at an exon-exon junction using Primer Express (Applied Biosystems) and the absence of DNA polymorphism in the target sequences was confirmed by BLAST searches against available web database (except D2 mice polymorphism rs29588067 present in probe set targeting *Nlg1* with insert A that could not be avoided). Sequences are provided in Table S1 (see *Supporting Information*). Additional information can be found in *Supporting Material and Methods*.

Total (Tot) and synaptoneurosomal (SN) protein extractions were done similarly to previously described (52). Forty  $\mu\text{g}$  (Tot) or 25 $\mu\text{g}$  (SN) of proteins were loaded on 7.5% pre-cast SDS-page gels (BioRad, Mississauga, ON), and transferred onto nitrocellulose membranes. Antibodies used were mouse anti-Neurologin 1 (1:1000; Synaptic Systems, Göttingen, Germany; #129 111), mouse anti-Actin (1:10000; Sigma Aldrich; #A5441), and HRP-conjugated donkey anti-mouse (1:2500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; #sc-2318). Additional information available in *Supporting Material and Methods*.

### **EEG/EMG electrode implantation surgery, recording and analyses**

Knockout (KO) mice for the *Nlg1* gene (mouse line B6;129-*Nlgn1*<sup>tm1Bros</sup>/J) and their wild-type (WT) littermates were implanted with electrodes for electroencephalography (EEG) and electromyography (EMG) recording as detailed previously (9,35). EEG/EMG was recorded continuously for 24h starting at light onset and behavioral states (wakefulness, NREM sleep

and REM sleep) were visually assigned to 4-sec epochs, as previously described (40). Duration of vigilance states was averaged for the full 24h, the first 12h (light period), the second 12h (dark period), and per hour. The bipolar EEG signal of artifact-free epochs was subjected to spectral analysis using fast Fourier transform to calculate the EEG power density between 0.5 and 20Hz (0.25Hz resolution) during vigilance states for the 24h recording. Delta power (1-4Hz EEG activity) during NREM sleep was computed and averaged for 12 intervals during the light period, for which an equal number of epochs contributed, and 6 intervals during the dark period. Additional information in *Supporting Material and Methods*.

### **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)**

Chromatin extraction and immunoprecipitation was performed as detailed previously (38). Anti-BMAL1 antibody was from Abcam (Cambridge, England; #ab3350), and anti-CLOCK from Abcam (#ab461) or Santa Cruz Biotechnologies (#sc-6927). For qPCR, the amplicon targeted a canonical E-box (CACGTG) located at position -653:-658 of the *Nlg1* gene (see Supporting Table S1) and standard cycling conditions were used. Additional details provided in *Supporting Material and Methods*.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. Mehdi Tafti for sharing some of the samples used here for qPCR (Fig. 4A). We are grateful to all colleagues that helped with the sleep deprivations (Brice Petit, Sonia Jimenez, Corinne Pfister, Anne Vassalli, Dr. Valérie Hinard, Dr. Julie Vienne, Dr. Hyun Hor, Silvia Raluca Netedu, Chandrou Koumar, Hélène Blais), and to Caroline Bouchard, Dr. Jean Paquet, Ga  tan Poirier and Ga  tan Tremblay for technical help. We also thank Dr. Guy Doucet and Alexandre Lebel for help with the social interaction apparatus, and Hannes Richter and Johann Weber of the Genomic Technologies Facility (GTF, University of Lausanne) for expert help with CHIP-qPCR experiments.

## REFERENCES

1. Ohlmann KK, O’Sullivan MI (2009) The costs of short sleep. *AAOHN J* 57(9):381-385.
2. Diekelmann S, Born J (2010) The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11(2):114-126.
3. Borbély AA (1982) A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiol* 1:195-204.
4. Daan S, Beersma DG, Borbély AA (1984) Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol* 246(2 Pt 2):R161-R183.

5. Mongrain V, Franken P. Genetic interaction between circadian and homeostatic regulation of sleep. In *The genetic basis of sleep and sleep disorders*, eds. Shaw P, Tafti N, Thorpy M (Cambridge University Press, Cambridge), chapter 17 (accepted 2012/09/24).
6. Tononi G, Cirelli C (2006) Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 10:49-62.
7. Steriade M, Timofeev I (2003) Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron* 37:563-576.
8. Krueger JM, et al. (2008) Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat Rev Neurosci* 9(12):910-919.
9. Mongrain V, et al. (2010) Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep* 33(9):1147-1157.
10. Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci* 25:103-126.
11. Rebola N, Srikumar BN, Mulle C (2010) Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 588(Pt 1):93-99.
12. Golomb D, Shedmi A, Curtu R, Ermentrout GB (2006) Persistent synchronized bursting activity in cortical tissues with low magnesium concentration: a modeling study. *J Neurophysiol* 95(2):1049-1067.

13. Tegnér J, Compte A, Wang XJ (2002) The dynamical stability of reverberatory neural circuits. *Biol Cybern* 87(5-6):471-481.
14. Vyazovskiy VV, et al. (2009) Cortical firing and sleep homeostasis. *Neuron* 63(6):865-878.
15. Chen C, Hardy M, Zhang J, LaHoste GJ, Bazan NG (2006) Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments. *Biochem Biophys Res Commun* 340(2):435-440.
16. Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Lüthi A (2006) Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function. *J Neurosci* 26(48):12456-12465.
17. Aton SJ, et al. (2009) Mechanisms of sleep-dependent consolidation of cortical plasticity. *Neuron* 61:454–466.
18. Dash MB, Douglas CL, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Tononi G (2009) Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci* 29(3):620-629.
19. Chih B, Gollan L, Scheiffele P (2006) Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin–neurexin complex. *Neuron* 51:171–178.
20. Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(3):1100-1105.

21. Barrow SL, et al. (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4:17.
22. Wittenmayer N, et al. (2009) Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(32):13564-13569.
23. Jung SY, et al. (2010) Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(10):4710-4715.
24. Kim J, et al. (2008) Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(26):9087-9092.
25. Peixoto RT, et al. (2012) Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76(2):396-409.
26. Blundell J, et al. (2010) Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci* 30(6):2115-2129.
27. Franken P, Chollet D, Tafti M (2001) The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *J Neurosci* 21(8):2610-2621.
28. Boucard AA, Chubykin AA, Comoletti D, Taylor P, Südhof TC (2005) A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* 48(2):229-236.

29. Reddy AB, et al. (2006) Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol* 16(11):1107-1115.
30. Varoquaux F, et al. (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51(6):741-754.
31. Franken P, et al. (2006) NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: Genotype and sex interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7118-7123.
32. Landolt H, et al. (2004) Caffeine attenuates waking and sleep electroencephalographic markers of sleep homeostasis in humans. *Neuropsychopharmacology* 29:1933-1939.
33. Huber R, Tononi G, Cirelli C (2007) Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis. *Sleep* 30(2):129-139.
34. Maret S, et al. (2007) Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(50):20090-20095.
35. Curie T, et al. Homeostatic and circadian contributions to EEG and molecular state variables of sleep regulation. *Sleep* (accepted 2012/08/11).
36. Gsell W et al. (2006) Differential effects of NMDA and AMPA glutamate receptors on functional magnetic resonance imaging signals and evoked neuronal activity during forepaw stimulation of the rat. *J Neurosci* 26(33):8409-8416.

37. Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15(Spec 2): R271–R277.
38. Mongrain V, La Spada F, Curie T, Franken P (2011) Sleep loss reduces the DNA-binding of BMAL1, CLOCK and NPAS2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex. *PLoS One* 6(10):e26622.
39. Wang H, Liu Y, Briesemann M, Yan J (2010) Computational analysis of gene regulation in animal sleep deprivation. *Physiol Genomics* 42(3):427-436.
40. Franken P, Malafosse A, Tafti M (1999) Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep* 22(2):155-169.
41. Suzuki K, et al. (2012) Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76(2):410-422.
42. Comoletti D, et al. (2003) Characterization of the interaction of a recombinant soluble neuroligin-1 with neurexin-1beta. *J Biol Chem* 278:50497–50505.
43. Kattenstroth G, Tantalaki E, Südhof TC, Gottmann K, Missler M (2004) Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires alpha-neurexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(8):2607-2612.
44. Chubykin AA, et al. (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54(6):919-931.



45. Tamaru T, et al. (2000) Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci* 20:7525-7530.
46. Naidoo N, et al. (2012) Role of Homer proteins in the maintenance of sleep-wake states. *PLoS One* 7(4):e35174.
47. Leemburg S, et al. (2010) Sleep homeostasis in the rat is preserved during chronic sleep restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(36):15939-15944.
48. Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455(7215):903-911.
49. Kotagal S, Broomall E (2012) Sleep in children with autism spectrum disorder. *Pediatr Neurol* 47(4):242-251.
50. Franken P, Thomason R, Heller HC, O'Hara BF (2007) A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: a strain comparison. *BMC Neurosci* 8:87.
51. Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbély AA (1991) Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol* 261(1 Pt 2):R198-R208.
52. Seibt J, et al. (2012) Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo. *Curr Biol* 22(8):676-682.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Effect of sleep deprivation (SD) on the expression of *Nlg1* transcript variants in different mouse strains.** **A)** Schematic view of the *Nlg1* mRNA showing the position of splice sites and amplicons targeted by qPCR probe sets (A and NA or B and NB: with and without insert A or B, respectively; C: common probe targeting all variants). Dark grey: cholinesterase domain, 94-1878bp; blue: transmembrane domain, 2086-2142bp; light blue: PSD95 binding domain, 2512-2529bp. **B)** Relative expression of *Nlg1* transcripts in the forebrain measured by qPCR in C57BL/6J (B6) and AKR/J (AK) mice at ZT6 (6h after light onset) in control condition (n=4 for B6 and AK) or after a 6h SD (n=3 for B6, n=4 for AK). Strain-by-Condition ANOVAs revealed a significant Condition effect showing that SD decreased the expression of *Nlg1* containing insert B and common *Nlg1* ( $F_{1,12} \geq 5.1$ ,  $p < 0.05$ ). A Strain-by-Condition interaction for *Nlg1* with insert A ( $F_{1,12} = 6.8$ ,  $p < 0.05$ ) showed that SD increased expression only in AK mice. AK mice also expressed more common *Nlg1*, *Nlg1* without insert A and without insert B than B6 mice (Strain effects:  $F_{1,12} \geq 9.8$ ,  $p < 0.01$ ). **C)** Relative expression of *Nlg1* transcripts in the forebrain of DBA/2J (D2) mice measured by qPCR at ZT6 in control condition or after a 6h SD in mice submitted to either a sham surgery (n=7 per group) or an adrenalectomy (ADX; n=6 per group). Condition effects revealed that SD significantly decreased the expression of *Nlg1* without insert A and with insert B ( $F_{1,22} \geq 4.2$ ;  $p \leq 0.05$ ), and a similar tendency was found for the common *Nlg1* ( $F_{1,22} = 3.7$ ,  $p < 0.07$ ). \*:  $p < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $p < 0.07$  between indicated values.

**Figure 2: Effect of sleep deprivation (SD) on the level of NLG1 protein in different mouse strains. A)** Western blot showing NLG1 level in the synaptoneurosomal fraction (SN) of the anterior (Ant) part of the forebrain in 4 control (C) and 4 SD C57BL/6J (B6) mice. The endogenous control Actin is also shown. **B)** Quantification of Western blots of NLG1 in total protein fraction (Tot) and SN of the anterior and posterior (Post) parts of B6 mice forebrain (n=10 or 11 per group). SD significantly decreased the level of NLG1 in Ant SN ( $t = 2.4$ ,  $p < 0.05$ ). **C)** Western blot showing NLG1 in the SN of the Ant brain in 5 control (C) and 5 SD AKR/J (AK) mice. The control Actin is shown. **D)** Quantification of the Western blots obtained for NLG1 in Tot and SN of Ant and Post parts of AK mice forebrain (n=5 to 7 per group). SD significantly increases the level of NLG1 in the Ant SN ( $t = -3.5$ ,  $p < 0.05$ ). \*:  $p < 0.05$  compared to control.

**Figure 3: Effect of a *Nlg1* mutation on sleep structure and cortical synchrony. A)** Duration of vigilance states in wild type (WT, +/+, n=10) and *Nlg1* KO (-/-, n=12) mice for 24h, 12h light and 12h dark periods. For the 24h and the 12h dark period, *Nlg1* KO mice spend less time in wakefulness and more in NREM sleep ( $t \geq 2.5$ ,  $p < 0.05$  and  $t = -2.6$ ,  $p < 0.05$ , respectively). **B)** Duration of vigilance states per hour in WT and KO mice. Repeated measure ANOVAs revealed significant Genotype-by-Time interactions for wake, NREM and REM sleep ( $F_{23,460} > 1.9$ ,  $p < 0.01$ ). Differences between KO and WT are indicated by red symbols ( $p < 0.05$ ). **C)** Mean duration of wake bouts in WT and KO mice for 24h, 12h light and 12h dark periods. For the 24h and the 12h dark period, the duration of wake bouts was lower in KO mice

compared to WT ( $t \geq 2.2$ ,  $p < 0.05$ ). **D)** Spectral power calculated for the 3 vigilance states in WT and *Nlg1* KO mice. Red symbols indicate significant between-genotype differences ( $p < 0.05$ ). **E)** 24h time course of delta power in WT and KO mice. Two-way repeated measure ANOVA revealed a significant Genotype-by-Time interaction ( $F_{17,340} = 2.3$ ,  $p < 0.05$ ). Pink symbols indicate a trend for difference between WT and KO ( $p < 0.1$ ). **F)** Relative expression of *Homer1a*, *Bdnf* and *Per2* in the forebrain of WT and *Nlg1* KO mice measured by qPCR at ZT6 in control condition or after a 6h SD ( $n = 6$  per group). Condition effects revealed that SD significantly increased the expression of all three genes in both genotypes ( $F_{1,20} > 9.6$ ,  $p \leq 0.005$ ). \*\*:  $p < 0.01$  between indicated values.

**Figure 4: Time-of-day expression of *Nlg1* and binding of its gene by core clock transcription factors.** **A)** Relative mRNA expression of the different *Nlg1* transcript variants measured at ZT0 (light onset), ZT6, ZT12 (light offset) and ZT18 by qPCR in the forebrain of C57BL/6J (B6) and AKR/J (AK) mice ( $n = 5-8$  per group). Strain-by-Time ANOVA revealed that the expression of *Nlg1* containing insert B is affected by time ( $F_{3,49} = 11.7$ ,  $p < 0.01$ ) with highest level at ZT6. A significant effect of strain was also observed for *Nlg1* with and without insert B ( $F_{1,49} \geq 4.4$ ,  $p < 0.05$ ). \*:  $p < 0.05$  between indicated values. **B)** Diagram of the mouse, rat and human *Nlg1* gene showing the position of E-boxes surrounding the transcription start sites (arrows). Numbers refer to position relative to the respective transcription start sites. Red E boxes represent CANNTG sequences and orange E boxes canonical CACGTG sequences. The absence of E in the box indicating the presence of multiple E-boxes. **C)** Binding of BMAL1 and

CLOCK to the canonical E-box of mouse *Nlg1* measured at ZT0, -6, -12 and -18 (n=3 per point, except n=2 for ZT12). One-way ANOVAs showed that both BMAL1 and CLOCK bind to *Nlg1* in a time-of-day dependent manner ( $F_{3,7} \geq 4.2$   $p=0.05$ ; \*:  $p < 0.05$  between indicated values). **D)** Binding of BMAL1 and CLOCK to the canonical E-box of mouse *Nlg1* measured at ZT6 after 6h of SD and expressed relative to the binding in undisturbed control (n= 5 per group). T-tests revealed that SD decreased CLOCK binding to *Nlg1* ( $t=-15.1$ ,  $p < 0.001$ ), while a tendency was observed for BMAL1 binding ( $t=-1.7$ ,  $p=0.17$ ). **E)** Model showing how elevated sleep pressure could change the expression of *Nlg1*: prolonged wakefulness could lead to a detachment of the CLOCK:BMAL1 complex from the *Nlg1* gene, which would decrease expression of *Nlg1* with insert B and synaptic NLG1 level, and consequently downregulate NMDAR function.

## **SUPPORTING INFORMATION (SI)**

### **SUPPORTING MATERIAL AND METHODS**

#### **Reverse Transcription and Quantitative PCR**

RNA extraction and reverse transcription were performed as detailed before (1-3). Briefly, RNA was extracted from the forebrain using the RNeasy Lipid Tissue Midi kit and was Dnase-treated (QIAGEN, Hombrechtikon, Switzerland). RNA amount was verified with a NanoDrop ND-1000 or ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE), and the quality of RNA samples was verified on Agilent 2100 bioanalyzer chips (Agilent Technologies, Basel, Switzerland) or using agarose gel electrophoresis. Then, 0.5-3 µg of RNA was used for reverse transcription using random hexamers and Superscript II or III reverse transcriptase (Invitrogen, Basel), according to standard procedures. Quantitative PCR was performed using an ABI PRISM 7900 detection system (Applied Biosystems, Switzerland) or a Viia 7 real-time cyclers (Life Technologies, Burlington, ON). Individual mouse cDNA was diluted and used in 10 µL reaction with TaqMan Master Mix reagent (Applied Biosystems/Life technologies) under standard cycling conditions: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec, and 60°C for 1 min. Assays were designed at an exon-exon junction using Primer Express (Applied Biosystems) and the absence of DNA polymorphism in the target sequences was confirmed

by BLAST searches against available web database (except D2 mice polymorphism rs29588067 present in probe set targeting *Nlg1* with insert A that could not be avoided). Primers were purchased from Invitrogen, Life Technologies, Operon (Huntsville, AL) or Microsynth (Balgach, Switzerland) and probes, from Eurogentec (Seraing, Belgium) or Operon. Sequences are provided in Table S1. TaqMan Gene Expression Assay # Mm04230607\_s1 was used for *mBdnf*. Each PCR reaction was done in triplicate. The most stable endogenous controls were selected among *Actin*, *Tbp*, *Gusb* and *Rsp9* using geNorm v3.5 (4) or Expression Suite v1.0 (Life Technologies), and 2 (Fig. 1B) or 3 (Fig. 1C, 3F and 4A) controls were used for normalization. Relative quantification was calculated using the modified  $\Delta\Delta C_t$  method from qBase v1.3.5 (5) or Expression Suite v1.0.

### **Protein extraction and Western Blotting**

At the end of SD, brains from B6 and AK mice were rapidly removed, dissected and frozen in liquid nitrogen. Dissection involved removal of cerebellum and olfactory bulb, and separation of the anterior (Ant) and posterior (Post) part of the brain relative to the bregma. Total (Tot) and synaptoneurosomal (SN) protein extractions were done similarly as previously described (6). Briefly, brains were washed with cold PBS and homogenized in SN lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, phosphatase and protease inhibitors cocktail 1:100 [Sigma Aldrich, Oakville, ON]) using a rotor stator homogenizer (Fisher Scientific, Ottawa, ON). A volume was sonicated (Q Sonica, Newtown, CT), centrifuged for 2 min at 16200 g, and the supernatant represented the total protein fraction. The remaining

fraction of the homogenate was mixed with lysis buffer, centrifuged for 2 min at 2000 g and the supernatant was filtered using a 10 µm pore nylon mesh filter (Small Parts Inc., Logansport, IN) and then a 5 µm pore centrifugal filter (Ultrafree-CL®, Millipore, Billerica, MA), and further centrifuged at 5000 g for 15 min. The pellet was resuspended in boiling lysis buffer and represented the SN protein fraction. To further purify protein extracts, a 1:1 (Tot) or 1:1.5 (SN) ratio of protein:buffer was centrifuged at 16200 g for 2 min (Tot) or 2000 g for 2 min (SN). Protein concentration was determined using the Lowry Assay and a Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, Nepean, ON). Forty µg (Tot) or 25 µg (SN) of proteins were loaded on 7.5% pre-cast SDS-page gels (BioRad, Mississauga, ON), and transferred onto nitrocellulose membranes.

Blots were blocked for 30 min in PBST containing 5% non-fat dry milk. Antibodies used were mouse anti-Neurologin 1 (1:1000; Synaptic Systems, Göttingen, Germany; #129 111), mouse anti-Actin (1:10000; Sigma Aldrich; #A5441), and HRP-conjugated donkey anti-mouse (1:2500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; #sc-2318). Membranes were revealed using Immun-Star Chemiluminescent kit (BioRad), signal quantification was done using QuantityOne (Bio-Rad), and NLG1 level was normalized relative to Actin.

### **EEG/EMG electrode implantation surgery**

We used knockout (KO) mice for the *Nlg1* gene (mouse line B6;129-*Nlg1*<sup>tm1Bros</sup>/J) and their wild-type (WT) littermates, which are normal and fertile. Electrode implantation for



electroencephalography (EEG) and electromyography (EMG) recording was performed as detailed previously (1,2). Briefly, when mice reached 9-10 weeks, surgery was performed under deep Ketamine/Xylazine anesthesia (120/10 mg/kg, intraperitoneal injection). Two gold-plated screws (diameter 1.1mm) served as EEG electrodes and were screwed through the skull over the right cerebral hemisphere (anterior: 1.7 mm lateral to midline, 1.5 mm anterior to bregma; posterior: 1.7 mm lateral to midline, 1.0 mm anterior to lambda). An additional screw placed on the right hemisphere (6 mm lateral to midline, 3 mm posterior to bregma) served as a reference. Three other screws were implanted over the left hemisphere as anchors. Two gold wires served as EMG electrodes and were inserted between neck muscles. The EEG and EMG electrodes were soldered to a connector and, together with the anchor screws, cemented to the skull. Four days after surgeries, mice were connected to a swivel contact, and animals were allowed a week of habituation before recording.

### **EEG recording and analyses**

EEG/EMG was recorded continuously for 24h starting at light onset. Signals were amplified (Lamont amplifiers), sampled at 256 Hz and filtered using the software Stellate Harmonie (Natus, San Carlos, CA). Behavioral states (wakefulness, NREM sleep and REM sleep) were visually assigned to 4-sec epochs, as previously described (7), and artifacts were simultaneously identified. The duration of each state was averaged for the full 24h, the first 12h (light period), the second 12h (dark period), and per hour. Spectral analysis was performed on the bipolar EEG signal of artifact-free epochs using fast Fourier transform to

calculate the EEG power density between 0.5 and 20 Hz (0.25 Hz resolution) during wakefulness, NREM and REM sleep for the 24h recording. Delta power (1-4 Hz EEG activity) during NREM sleep was also separately computed and averaged for 12 intervals during the light period, for which an equal number of epochs contributed, and 6 intervals during the dark period.

### **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)**

Chromatin extraction and immunoprecipitation was performed using the Magna ChIP G commercial kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions (8). Cortices were chopped in small pieces and incubated for 10 min in 1% formaldehyde followed by a 5 min glycine-quenching. After washes, cellular and nuclear lysis, chromatin breakdown to 300–1000 bp was performed with a Bioruptor UCD-200TO (Diagenode SA, Liège, Belgium). A pre-clear step was performed (1h at 4°C with 40 µl of magnetic beads) before overnight incubation of chromatin and beads with antibodies. Anti-BMAL1 antibody was purchased from Abcam (Cambridge, England; #ab3350), and anti-CLOCK from Abcam (#ab461) or Santa Cruz Biotechnologies (#sc-6927). All samples were also identically submitted to a no-antibody condition (mock condition) used to take into account nonspecific binding. DNA purification was performed using the silica columns provided with the kit (Magna ChIP G, Millipore). For qPCR, the amplicon targeted a canonical E-box (CACGTG) located at position -653:-658 of the *Nlg1* gene (see supporting Table S1) and was designed with Primer Express v2.0 (Applied Biosystems). Purified immunoprecipitated DNA

was slightly diluted (4/5) and mixed with 0.9 mM of each primer, 0.25 mM of probe and Taqman MasterMix reagent (Applied Biosystems) or FastStart Universal Probe Master (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and standard cycling conditions were used (see above).

### **Statistical analyses**

The effect of SD on the expression of *Nlg1* transcript variants was assessed using two-way analysis of variance (ANOVAs) with factors Group (B6 vs. AKR or Sham vs. ADX) and Condition (control vs. SD). The effect of SD on Tot and SN levels of NLG1 in the two brain regions was compared between control and SD mice using paired t-tests. T-tests were also used to compare, between genotypes, the duration of vigilance states per 24 or 12h and spectral activity per 0.25 Hz. Hourly duration of vigilance states and time course of delta power were compared using two-way repeated-measure ANOVAs with factors Genotype (WT vs. KO) and Hour or Interval. The effect of genotype and SD on gene expression was assessed using two-way ANOVAs with factors Genotype (WT vs. KO) and Condition (control vs. SD). To assess the effect of time-of-day on the expression of *Nlg1* transcript variants we used two-way ANOVAs with factors Strain (B6 vs. AKR) and Time (ZT0, 6, 12 and 18). For the CHIP experiment, one-way ANOVAs with factor Time (ZT0, 6, 12, 18) were performed and, the effect of SD on clock genes was analyzed using single sample t-tests. Significant effects were decomposed, when appropriate, using planned comparisons, and significance levels for repeated measures were corrected using Huynh-Feldt correction. Statistical analyses were performed using Statistica

(StatSoft Inc., Tulsa, OK). Significance threshold was set to 0.05 and data are reported as mean  $\pm$  SEM. The number of animals used for each experiment is reported in figure legends.

### **Assessment of social interaction behavior**

A three-chamber paradigm was used to assess social interaction behavior in *Nlg1* KO mice (9). Briefly, animals were handled and habituated to the experimental room and setup for one week prior to testing. Mice behavior was observed, timed and video recorded over two 10 min sessions. For the first session, the test mouse was exposed to an empty cage and a cage containing a stranger mouse of the same age and sex. Total interaction time (nose touching, sniffing, climbing) and number of interactions with both the empty cage and the stranger mouse were measured during the session. For the second session, the empty cage was replaced by a new (non familiar) stranger mouse, and total interaction time and number of interactions with both the familiar mouse (from session 1) and the new stranger mouse were measured. The object mice (confined to cages) were randomly assigned to each chamber and previously habituated to cage confinement. Preference for social interaction and social novelty was assessed using two-way ANOVAs with factor Genotype (WT [+/-] vs. KO [-/-]) and Stranger (empty cage vs. stranger 1 or stranger 1 vs. stranger 2).

### **Neurological severity test**

Neurological functions were assessed in WT and *Nlg1* KO mice using a standardized 10-point Neurological Severity Score (NSS) as previously described (10,11). This abbreviated version of the original 25-point scale (12) includes 10 individual parameters that are easy to assess and relatively independent of the investigator's subjective evaluation. The 10 parameters are representative of overall motor function, alertness and physiological behavior, where no point was given for a successfully executed task and one point for failing. A maximum NSS score of 10 points indicates severe neurological impairments with failure at all tasks and a minimal score of zero refers to a normally behaving mouse. To control for possible time-of-day effect, the NSS test was administered at ZT0 (beginning of the rest period) and ZT11 (end of the rest period, beginning of the active period). However, a Genotype-by-Time ANOVA revealed no significant effect of time-of-day, and data were therefore presented as a mean of the two testing times and compared between genotypes using a T-test.

### **Optical imaging of the brain hemodynamic response**

The brain hemodynamic response to somatosensory stimulation was assessed in *Nlg1* KO mice using multispectral optical imaging as previously described (13). Briefly, under deep anesthesia (Ketamine/Xylazine, 120/10 mg/kg), the skull was exposed and mice were positioned on a stereotaxic frame. Two electrodes were placed on each side of the left forepaw for stimulation using an electrical stimulator (A-M systems #2200, Carlsborg, WA).

The threshold for muscle response was determined using a 0.3 ms pulse and increasing current intensity. The mean threshold was  $0.86 \pm 0.027$  mA and did not differ significantly between genotypes (WT:  $0.95 \pm 0.06$ ; KO:  $0.81 \pm 0.05$ ,  $p=0.08$ ). For imaging, 2 fold-threshold intensity was used for electrical stimulation (3 Hz, 300  $\mu$ s, between 1 mA and 2.6 mA) and stimulations were repeated every 20 sec with a 1 to 3 sec random jitter to avoid systemic synchronization. Mineral oil was added to the skull to prevent drying and maintain camera focus. Functional images (typical size 450 x 400 pixels) were recorded under a multiple wavelength flashing illumination (525, 590 and 637 nm) produced by light emitting diodes (LED, Optek Technologies, TX, USA) at a sampling rate of 5 Hz per wavelength using a 12-bit CCD camera (CS3960DCL, Toshiba Teli, Ontario, CA). Reflectance signals from the LED collected with the camera were converted into changes in absorption for the three wavelengths, followed by extraction of relative changes in oxyhemoglobin (HbO) and deoxyhomoglobin (HbR) using a modified Beer-Lambert law (13,14).

Spatial T-statistic HbO and HbR response maps were constructed from the mean and SEM of the early and filtered response to all stimulations. This was calculated for each pixel by taking the mean between 1 and 3 sec after stimulation, expressed relative to the median of 2 sec before stimulation on temporally high pass filtered (0.03 Hz cutoff) and spatially low pass filtered data (Gaussian, 0.5 pixel standard deviation). Animals that did not respond on these maps were removed from further analysis ( $n=2$ ). For each mouse, a region of interest (ROI; fixed size of 75 x 75 pixels) was selected to cover the right somatosensory cortex (contralateral). Then, after standard bandpass filtering of the raw data between 0.01 and

0.67 Hz, time courses of the relative changes were built for HbO and HbR for the selected ROI as a function of the median of 3 sec prior to stimulation. Only responses with an observable peak in HbO combined with a decrease in HbR between 1 and 5 sec post-stimulation were kept to construct the mean time course of one animal. The percent response was calculated as the number of responses divided by the total number of stimulations multiplied by 100. One mouse was excluded because it did not show either a 50% response rate or 10 observable responses. Percent response was compared between genotypes using a T-test and time courses of HbO and HbR were compared using Genotype-by-Time ANOVAs, with degrees of freedom adjusted for nonsphericity using the Greenhouse-Geisser method.

## SUPPORTING REFERENCES

1. Mongrain V, et al. (2010) Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep* 33(9):1147-1157.
2. Curie T, et al. Homeostatic and circadian contributions to EEG and molecular state variables of sleep regulation. *Sleep* (accepted 2012/08/11).
3. Franken P, Thomason R, Heller HC, O'Hara BF (2007) A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: a strain comparison. *BMC Neurosci* 8:87.
4. Vandesompele J, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034.
5. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8(2):R19.
6. Seibt J, et al. (2012) Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo. *Curr Biol* 22(8):676-682.
7. Franken P, Malafosse A, Tafti M (1999) Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep* 22(2):155-169.



8. Mongrain V, La Spada F, Curie T, Franken P (2011) Sleep loss reduces the DNA-binding of BMAL1, CLOCK and NPAS2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex. *PLoS One* 6(10):e26622.
9. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR (2011) Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp* (48)Pii:2473.
10. Flierl MA, et al. (2009) Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc* 4(9):1328-1337.
11. Stahel PF, et al. (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(2):369-380.
12. 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(10):557-568.
13. Dubeau S, Ferland G, Gaudreau P, Beaumont E, Lesage F (2011) Cerebrovascular hemodynamic correlates of aging in the Lou/c rat: a model of healthy aging. *Neuroimage* 56(4):1892-1901.
14. Dunn AK, et al. (2003) Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation. *Opt Lett* 28:28-30.

## SUPPORTING FIGURE LEGENDS

**Supporting Figure S1: A)** Blot showing forebrain NLG1 level in WT (+/+) and *Nlg1* KO (-/-) mice, and the endogenous control Actin. **B)** Neurological severity score (NSS) in WT and *Nlg1* KO mice (mean of two tests performed at ZT0 and ZT11, n=12 per genotype). NSS did not differ between genotypes ( $t=-1.3$ ,  $p>0.2$ ). **C)** Social behavior in *Nlg1* KO mice and WT littermates. Two-way repeated measure ANOVA with factors Genotype (+/+ vs. -/-) and Stranger (empty vs. stranger 1) showed a Stranger effect for session 1 ( $F_{1,13}=5.3$ ,  $p<0.05$ ), with mice spending more time interacting with the stranger mouse compared to the empty cage. For session 2, a significant Genotype-by-Stranger (stranger 1 vs. stranger 2) interaction was observed showing that only WT spend more time interacting with the new stranger mouse 2 compared to the familiar stranger 1 ( $F_{1,13}=72.3$ ,  $p<0.001$ ). \*\*\*:  $p<0.001$  compared to stranger 1 for WT. **D)** Percent response of brain hemodynamic parameters to forepaw stimulation in WT (n=11) and *Nlg1* KO (n=16) mice. Compared to WT, KO mice showed a lower percent response to stimulation ( $t=2.1$ ,  $p<0.05$ ). **E)** Oxy- and deoxyhemoglobin response of the cerebral cortex following forepaw stimulation for WT (n=11) and *Nlg1* KO (n=16) mice. Analysis of the first 5 sec after stimulation revealed a significant Genotype-by-Time interaction for oxyhemoglobin ( $F_{24,600}=4.0$ ,  $p<0.05$ ) with KO mice showing lower levels at 4 sec post-stimulation (red symbols:  $p\leq 0.05$  compared to WT). For deoxyhemoglobin, only a significant Time effect was observed ( $F_{24,600}=33.1$ ,  $p<0.001$ ; Group-by-Time interaction:  $F_{24,600}=0.7$ ,  $p=0.8$ ).

**Supporting Figure S2: Time-of-day expression of *Nlg1* measured using the common probe.**

Relative mRNA expression measured at ZT0 (light onset), ZT6, ZT12 (light offset) and ZT18 by qPCR in the forebrain of C57BL/6J (B6) and AKR/J (AK) mice (n=5-8 per group). Strain-by-Time ANOVA revealed that the expression is affected by time ( $F_{3,47}=3.1$ ,  $p=0.03$ ) with highest level at ZT6. A significant effect of strain was also observed ( $F_{1,49}\geq 4.4$ ,  $p<0.05$ ) with B6 mice showing a higher expression.

**Supporting Table S1: Sequences for primers and probes used for qPCR**

<b>Gene Symbol</b>	<b>Direction</b>	<b>Sequence 5' to 3'</b>	<b>Accession #</b>
<i>mNlg1A</i>	fwd	ACGGTGCTGAAGATGAAG	NM_001163387
	rev	CAGTACCTTCCATGTAAGAG	
	probe	TCCCAAACCAGTGATGGTGTACATCCA	
<i>mNlg1NA</i>	fwd	GGATGTGGTTTCATCATAC	NM_001163387
	Rev	TGTCCCGAATATCATCTTC	
	Probe	TCCAAGACCAGAGTGAAGACTGTC	
<i>mNlg1B</i>	fwd	GGTAACCGTTGGAGCAATTCA	NM_001163387
	Rev	CCAGCTGGAAAGGGCTGTT	
	Probe	CCAAAGGACTTTTTCAACGAGCAATAGCTCA	
<i>mNlg1NB</i>	fwd	CACTGTGTTTGGATCAGG	NM_001163387
	Rev	AAAAGTCCTTCAGAATAATGGG	
	Probe	GGTTCATGTGTCAACCTGCTGACT	
<i>mNlg1C</i>	fwd	TCCTTGCAATTTCTCCAAGA	NM_001163387
	rev	TTGGGTTTGGTATGGATGAA	
	probe	TGGTGACCCAAATCAACCAGTTCC	
<i>mNlg1 E-box</i>	fwd	TGGGAAAATATCTTTGGCCTATAAAA	NT_162143.3
	rev	GCACGGAAAGTGCCATGAA	
	probe	AGGTGGCAATTTCTTTCTTCTACACGTGG	
<i>mHomer1a</i>	fwd	GCATTGCCATTTCCACATAGG	NM_011982
	rev	ATGAACTTCCATATTTATCCACCTTACTT	
	probe	ACACATTCAATTCAGCAATCATGA	
<i>mPer2</i>	fwd	ATGCTCGCCATCCACAAGA	NM_011066
	Rev	GCGGAATCGAATGGGAGAAT	
	Probe	ATCCTACAGG CCGGTGGACAGCC	
<i>mRsp9</i>	fwd	GACCAGGAGCTAAAGTTGATTGGA	NM_029767
	rev	TCTTGCCAG GGTAAACTGA	
	probe	AAACCTCACGTTTGTCCGGAGTCCATACT	
<i>mActin</i>	Fwd	CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT	NM_007393
	Rev	CACAGCCTGGATGGCTACGT	
	Probe	TTGAGACCTTCAACACCCAGCCATG	
<i>mGusB</i>	fwd	ACGGGATTGTGGTCATCGA	NM_010368
	rev	TGACTCGTTGCCAAACTCTGA	
	probe	AGTGTCCCGGTGTGGGCATTGTG	
<i>mTbp</i>	fwd	TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC	NM_013684
	Rev	TTCTCATGATGACTGCAGCAA	
	Probe	TGCAAGAAATGCTGAATATAATCCCAAGCG	

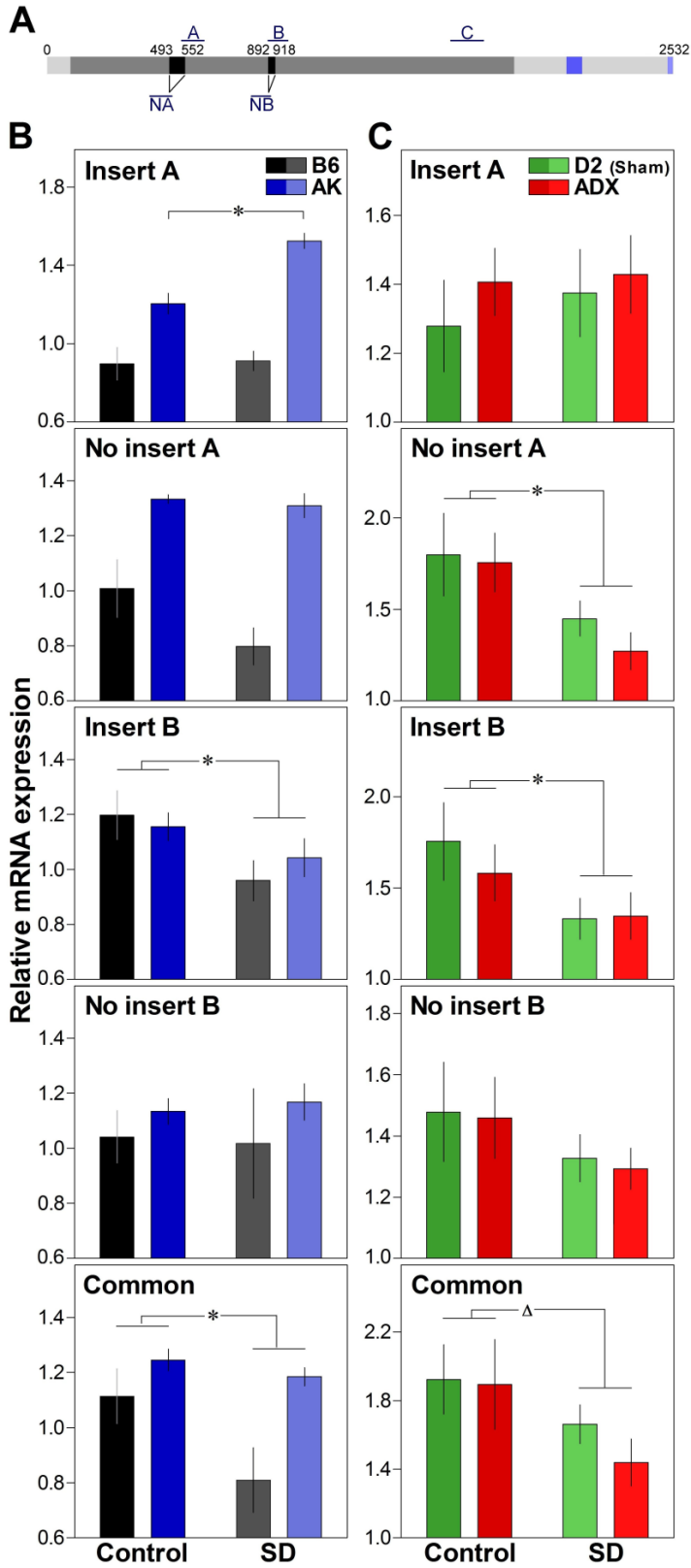


Figure 1

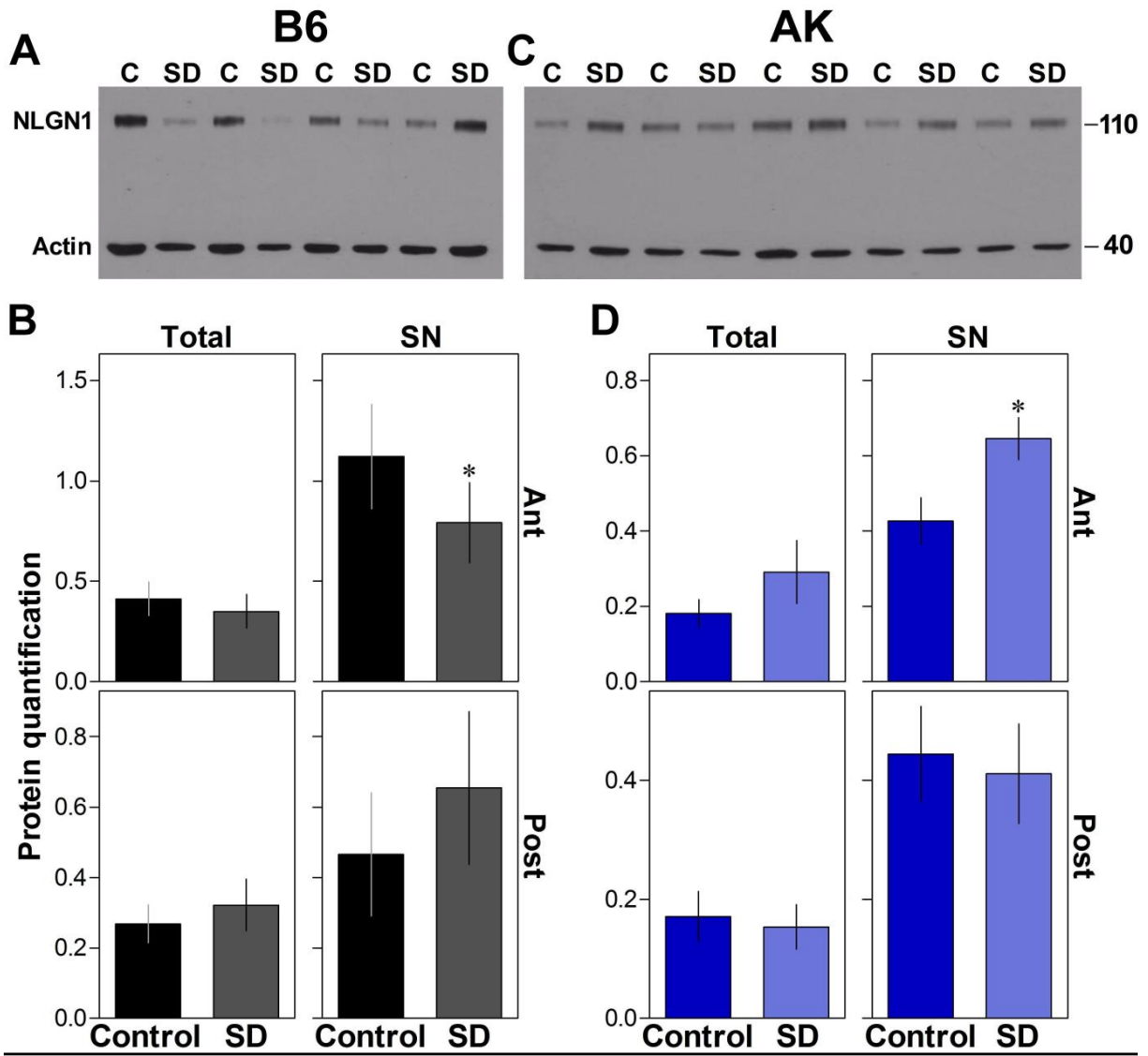


Figure 2

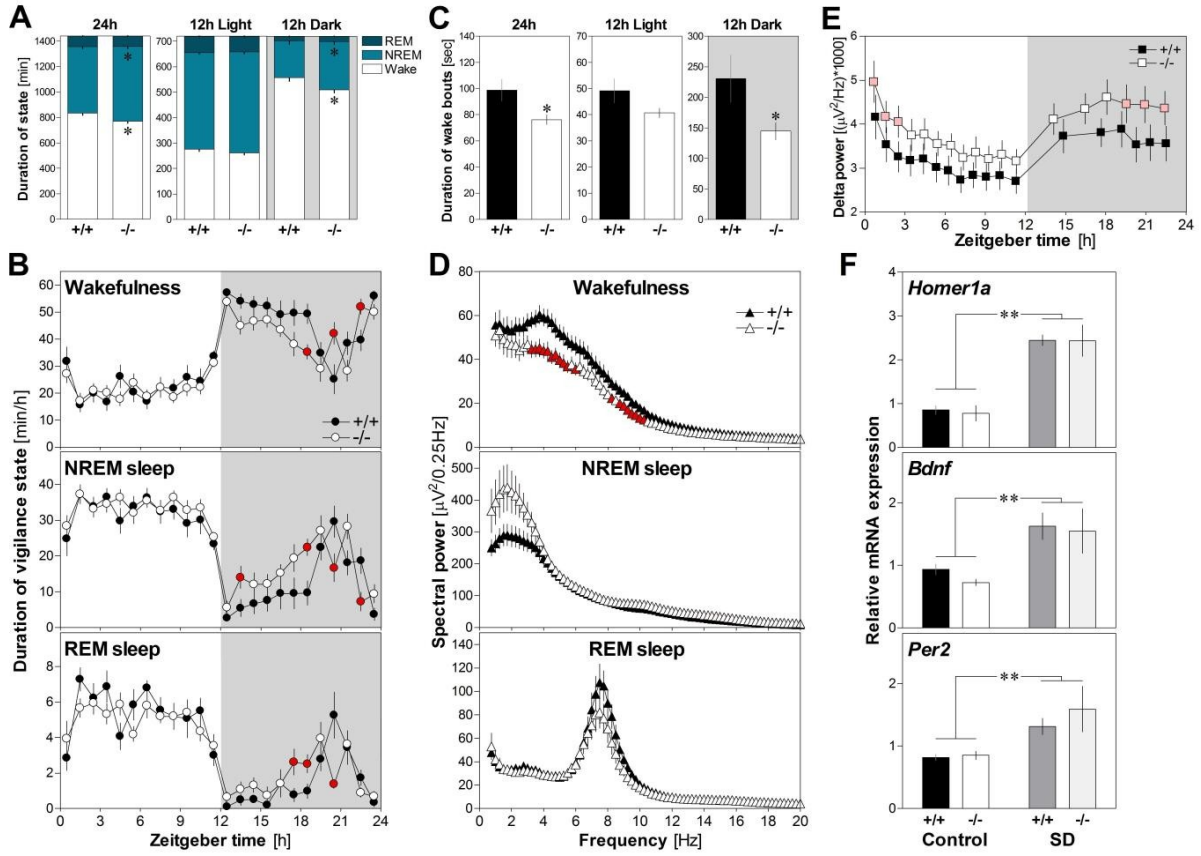


Figure 3

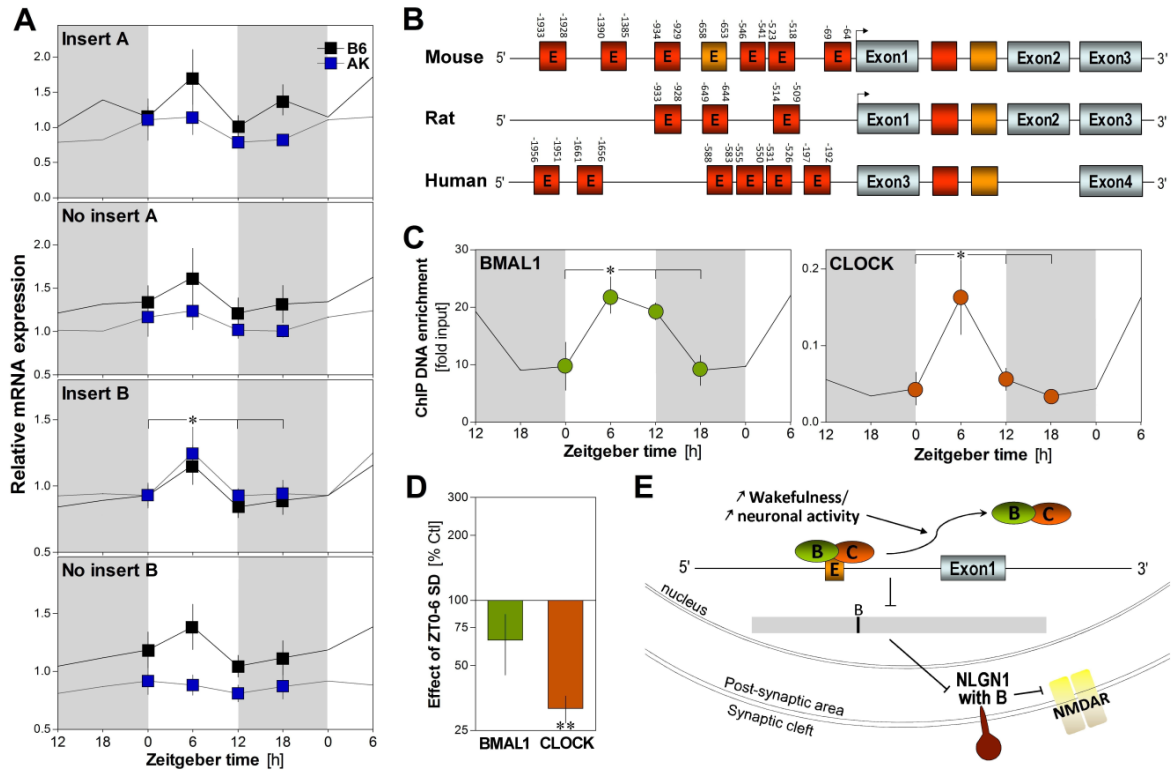


Figure 4



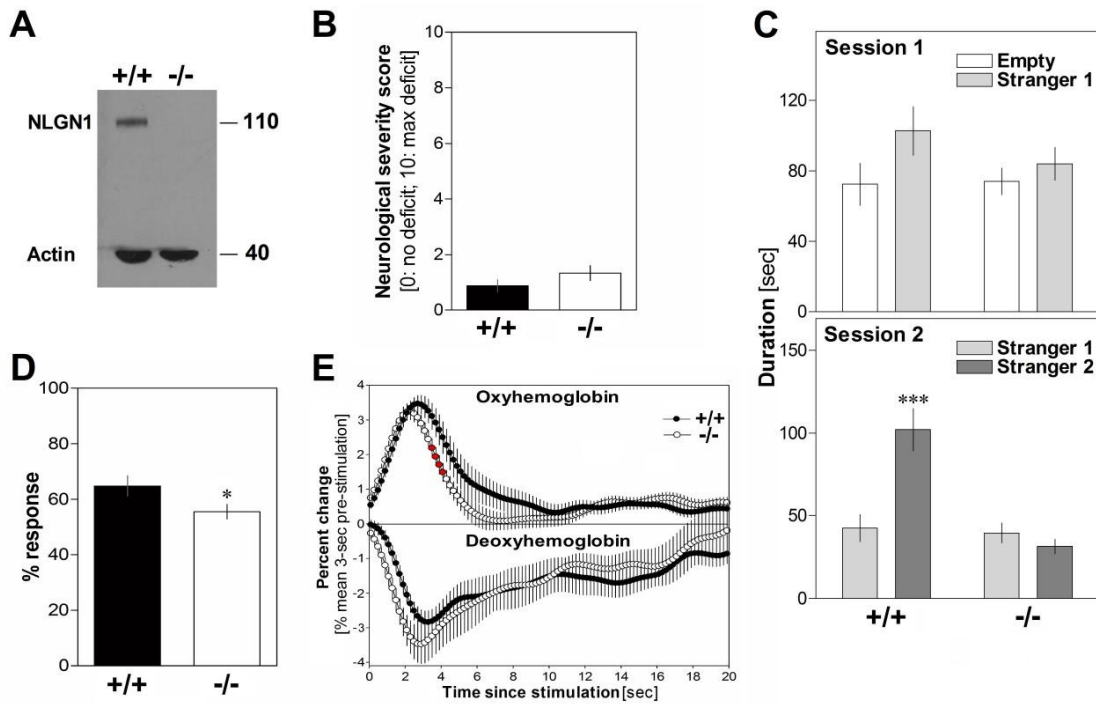


Figure S1

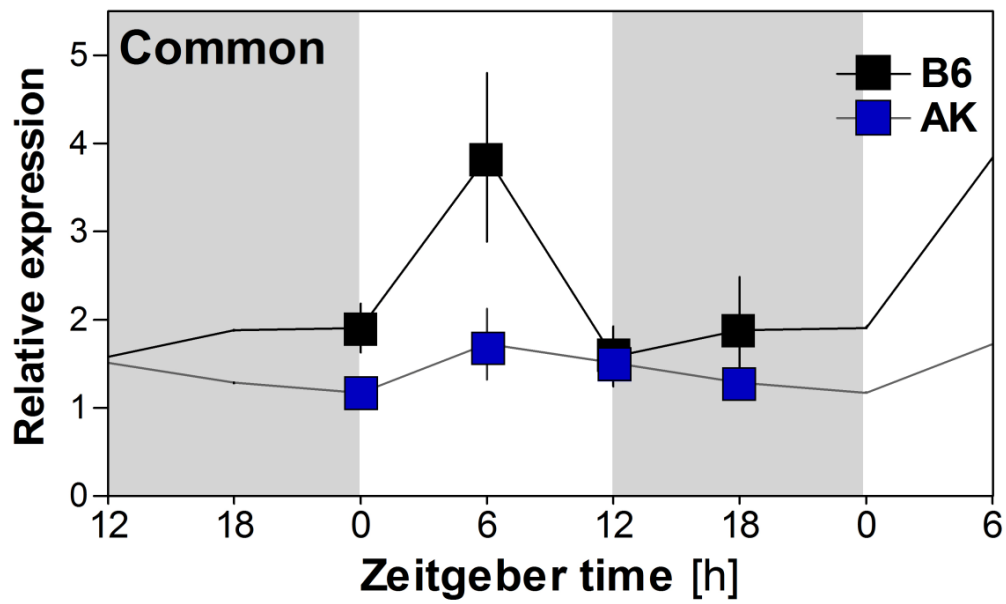


Figure S2

## **Chapitre 4 : Discussion**

### **4.1. Rappel des résultats principaux**

Dans ce projet, nous montrons un rôle de NLGN1 dans la régulation de l'éveil et du sommeil chez la souris. Nous avons premièrement observé qu'une pression élevée pour dormir module l'expression de différents variants de transcription de *Nlgn1* ainsi que celle de NLGN1 dans le cerveau de la souris. Les résultats obtenus dépendaient de la souche, ce à quoi on ne s'attendait pas. De plus, nous avons montré que l'absence de NLGN1 affecte la durée du sommeil et de l'éveil ainsi que la synchronisation de l'EEG pendant l'éveil et le SOL. Finalement, les résultats de l'article indiquent que les facteurs de transcription de l'horloge biologique semblent être à la base des changements au niveau de l'éveil et du sommeil observés dans l'expression de *Nlgn1*.

La discussion du mémoire portera principalement sur les figures 1, 2 et 3 de l'article qui sont plus directement liées à mes travaux de maîtrise. Ainsi, je discuterai moins de la figure 4 et des figures supplémentaires retrouvées dans l'article.

### **4.2. Effet d'un éveil prolongé sur l'expression génique de Nlgn1**

En premier lieu, nous avons observé que, suite à une privation de sommeil, il y a des changements dans l'expression de l'ARNm de *Nlgn1* qui dépendent spécifiquement du

variant de transcription de *Nlgn1* et de la souche de souris étudiée. Ceci constitue la première étape pour l'étude du rôle d'une molécule dans le sommeil et l'éveil : montrer que son niveau varie en fonction de l'éveil et du sommeil. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet d'une augmentation de la pression de sommeil, effectuée par une privation de sommeil, sur différents variants transcriptionnels de *Nlgn1*. Les résultats nous permettent de faire une nouvelle observation que différents variants se comportent différemment, ceci suggérant des rôles différents et variés de *Nlgn1*, dépendant des variants transcriptionnels impliqués.

*Nlgn1* subit un épissage alternatif donnant lieu à 4 variants de transcription ou isoformes, dépendant de la présence ou de l'absence de 2 inserts retrouvés ou pas dans le gène. En effet, on retrouve *Nlgn1* avec insert A et avec insert B (*Nlgn1AB*), *Nlgn1* avec l'insert A (*Nlgn1A*) seulement, *Nlgn1* avec l'insert B seulement (*Nlgn1B*) et *Nlgn1* sans inserts (Ichtchenko et al., 1995). Le fait de savoir quel isoforme est exprimé est important puisque plusieurs isoformes d'un même gène peuvent avoir des rôles différents. En effet, pour *Nlgn1*, l'insert A cible la protéine aux synapses inhibitrices et l'insert B aux synapses excitatrices, alors que la présence des 2 inserts cible la protéine aux synapses excitatrices également (Chih et al., 2006). De plus, la présence ou l'absence des inserts contrôle la liaison avec un partenaire de NLGN1, NRX (Ichtchenko et al., 1995). L'épissage alternatif de *Nlgn1* joue donc un rôle important dans la régulation des interactions avec des partenaires synaptiques aux synapses excitatrices et inhibitrices.

Ainsi, dans la première expérience, nous avons observé que la privation de sommeil augmente *Nlgn1A* chez la souche AK et diminue *Nlgn1B* ainsi que *Nlgn1C* (séquence

commune retrouvée chez tous les variants transcriptionnels) chez les souches AKR/J (AK) et C57BL/6J (B6). Ceci indique que l'effet de la privation de sommeil sur l'expression de *Nlgn1* varie selon la souche et dépend du variant transcriptionnel étudié. Plusieurs souches de souris ont été utilisées dans notre étude dans le but d'évaluer si les variations observées sont spécifiques à chaque souche ou si elles sont uniformes entre souches. Ceci est particulièrement intéressant vu la diversité de l'aspect récupérateur du sommeil d'une souche à l'autre pouvant ainsi être influencée par l'expression génique. Effectivement, la souche B6 représente la souche de souris dont le sommeil est très bien connu (Franken et al., 1999; Franken et al., 2001) et qui a une quantité intermédiaire de SOL par rapport aux autres souches (Franken et al., 2001; Huber et al., 2000). La souche AK représente une souche de souris qui dorment beaucoup et ont le plus de rebond d'ondes lentes suite à une privation de sommeil (Franken et al., 2001). Les souris AK ont aussi moins de fragmentation de leur sommeil et plus d'ondes delta à l'âge adulte (6 mois) par rapport à des souris de même souche plus jeunes ou plus âgées (Hasan et al., 2012). De plus, l'âge ne semble pas affecter le rebond de SOL suite à une privation de sommeil chez les souris AK (Hasan et al., 2012). Ainsi, l'augmentation de *Nlgn1A* suite à une privation de sommeil observée spécifiquement chez la souche AK pourrait être liée au grand rebond d'AOL ainsi qu'à la longue période de sommeil caractéristiques de la souche AK par rapport aux autres souches. En particulier, une augmentation de *Nlgn1A* pourrait se traduire en une plus grande présence de NLGN1 aux synapses GABAergiques inhibitrices. En effet, l'administration d'un agoniste des récepteurs GABA augmente l'AOL dans le SOL subséquent (Faulhaber et al., 1997), augmentant ainsi la synchronie corticale (Révision par Bartos et al., 2007).

Chez les 3 souches que nous avons étudiées, on observe une diminution de *Nlgn1B* suite à une privation de sommeil. On peut émettre l'hypothèse qu'une augmentation de la pression pour dormir engendre une diminution de l'expression de NLGN1B au niveau des synapses glutamatergiques résultant en une altération de la connexion NLGN1-NRX. En effet, une étude récente a montré l'importance de l'insert B dans la transmission excitatrice au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe chez le rat (Shipman & Nicoll, 2012). En réalisant des constructions de NLGN avec des domaines de NLGN1 et de NLGN3, les auteurs ont trouvé que la partie importante dans la régulation des R-NMDA est celle contenant l'insert B, ce dernier étant retrouvé uniquement chez NLGN1. De plus, vu l'importance du gyrus dentelé dans la plasticité synaptique (ce dernier conserve sa plasticité même à l'âge adulte; Altman & Das, 1965), l'étude réalisée par Shipman & Nicoll (2012) souligne l'importance de l'insert B de NLGN1 dans le contrôle du fonctionnement des R-NMDA aussi bien que dans la potentialisation à long terme.

Finalement, nous avons vérifié que les modifications d'expression de *Nlgn1* suite à la privation de sommeil ne sont pas dues au stress. Effectivement, la privation de sommeil est généralement accompagnée d'une réponse au stress chez les rongeurs. Ceci est traduit par une augmentation du taux de corticostérone dans le sang (Spiegel et al., 1999; Joo et al., 2012) qui contribue considérablement à la réponse transcriptomique à la privation de sommeil (Mongrain et al., 2010). Une méthode souvent utilisée est le « *gentle handling* » (Franken et al., 1991). Même si cette méthode fait en sorte que les interventions afin de réveiller les animaux sont minimales dans le but de réduire le stress le plus possible,

l'expression de plusieurs gènes est affectée par le stress associé à la privation de sommeil et peut masquer les résultats interprétés comme étant dus à une privation de sommeil (Mongrain et al., 2010). Dans notre étude, cette méthode a permis de révéler que les changements dans l'expression de *Nlgn1* sont indépendants de la corticostérone. Ainsi, nous avons observé une diminution de *Nlgn1B* chez les deux groupes de souris de souche DBA/2J (D2).

Ainsi, les résultats obtenus ne confirment pas nécessairement notre hypothèse (diminution du taux de *Nlgn1* suite à une privation de sommeil), étant donné qu'on observe des variations dans les deux sens, ceci étant probablement dû à la différence de la fonction de chacun des isoformes de *Nlgn1*, ainsi qu'aux caractéristiques relatives au sommeil de chacune des souches étudiées. Les changements détectés dans l'ARNm suggèrent qu'on pourrait aussi détecter des changements au niveau protéique, comme observé pour d'autres gènes tel *Per2* (Curie et al., 2011). Ainsi, nous avons décidé d'étudier l'effet d'une augmentation de la pression de sommeil sur l'expression protéique de NLGN1.

#### **4.3. Effet d'un éveil prolongé sur la quantité de protéine NLGN1**

Étant donné que c'est la protéine NLGN1 qui module la plasticité synaptique, en interagissant avec d'autres protéines partenaires, il est essentiel d'évaluer l'effet de la privation de sommeil sur la quantité de NLGN1. De plus, quantifier les protéines totales donne une idée du changement général de NLGN1 dans la cellule suite à une privation de

sommeil. Or, comme NLGN1 exerce sa fonction spécifiquement au niveau synaptique (Song et al., 1999), il est aussi intéressant d'étudier l'expression de NLGN1 spécifiquement au niveau des synapses pour avoir une idée plus précise des changements observés. Aussi, les expériences ont été réalisées sur la partie antérieure ainsi que la partie postérieure du cerveau des souris. Ceci est particulièrement intéressant, puisque NLGN1 est une molécule synaptique retrouvée majoritairement au niveau du cortex (Song et al., 1999; *Allen institute for brain science mouse brain atlas*), région du cerveau dont la plus grande épaisseur et quantité se situent au niveau frontal, correspondant à la partie antérieure prélevée durant notre étude. De plus, la privation de sommeil affecte des fonctions spécifiques à la région antérieure du cerveau telle la prise de décision ainsi que certains types de mémoire.

Lors de l'étude de l'effet d'une privation de sommeil sur NLGN1, on constate qu'une privation de sommeil engendre une diminution de NLGN1 chez la souche B6 et une augmentation de NLGN1 chez la souche AK au niveau synaptoneurosomal antérieur. Tel que mentionné dans la discussion de l'article, nous ne pouvons pas être certains que l'anticorps utilisé identifie tous les isoformes de NLGN1 également, étant donné qu'il cible la séquence se trouvant juste avant l'insert A et couvrant le premier nucléotide de l'insert A. L'anticorps pourrait donc avoir une préférence pour la présence de l'insert A par rapport aux autres isoformes.

De manière très intéressante, et comme ce que nous avons observé au niveau de l'ARNm, les changements protéiques de NLGN1 dépendent aussi de la souche. Ainsi, il y a une augmentation de NLGN1 chez la souche AK (mêmes changements que ceux observés pour

*Nlgn1A* chez la souche AK), et une diminution de NLGN1 chez la souche B6 (même changements que ceux observés pour *Nlgn1B* et *Nlgn1C* chez la souche B6) suite à une privation de sommeil. En y ajoutant la possibilité de détection préférentielle de NLGN1A par l'anticorps utilisé, les changements observés pourraient en somme indiquer une augmentation de NLGN1A au niveau des synapses GABAergiques et une diminution de NLGN1B au niveau des synapses glutamatergiques chez les souris présentant le besoin de sommeil le plus intense, les AK. Ainsi, par ces observations, notre hypothèse (diminution de la protéine NLGN1 suite à une augmentation de la pression pour dormir) n'est pas totalement confirmée et les changements observés sont dépendants de la souche et, fort probablement, de l'insert également.

Les résultats de ces deux premières expériences étudiant l'effet d'une augmentation de la pression pour dormir sur le transcrite ainsi que le produit protéique de *Nlgn1* ne suivent pas nécessairement le sens des hypothèses émises. Comme les résultats observés changent dépendamment de la souche, une nouvelle hypothèse pourrait être que la privation de sommeil affecte différemment l'expression des isoformes de *Nlgn1*, et ce, de manière spécifique à la souche de souris. Ainsi, on pourrait suggérer que l'isoforme NLGN1B en particulier diminue au niveau des synapses glutamatergiques avec la durée de l'éveil chez les trois souches de souris étudiées suite à une augmentation de la pression pour dormir. De plus, en parallèle, nos résultats permettent de suggérer que l'isoforme NLGN1A, qui semble présent en plus grande quantité chez la souche AK, est associé à une synchronie corticale



augmentée chez ces souris suite à une privation de sommeil (étant donné que cette souche a un grand rebond d'AOL; Franken et al., 2001).

#### **4.4. Sommeil et activité EEG chez des souris n'exprimant pas NLGN1**

Le fait qu'une molécule soit différentiellement exprimée en fonction de l'éveil et du sommeil n'implique pas forcément un rôle de celle-ci dans la régulation du sommeil car ces changements pourraient seulement être conséquents et affecter d'autres fonctions physiologiques. Ainsi, pour évaluer l'implication de *Nlgn1* dans le sommeil et l'éveil, nous avons étudié l'effet d'une mutation de *Nlgn1* sur le sommeil des souris. La mutation choisie remplace les deux premiers exons du gène empêchant ainsi la production de la protéine (Varoqueaux et al., 2006; ceci est confirmé par l'étude de l'expression protéique de NLGN1 chez une souris de type sauvage ayant NLGN1 et une souris mutante n'exprimant pas NLGN1, montré dans le matériel supplémentaire de l'article). La quantification des stades de vigilance montre que les souris mutantes pour *Nlgn1* passent moins de temps éveillées et plus de temps endormies, particulièrement en SOL. En regardant plus en détail, nous avons noté que ces effets sont observés principalement pendant la période d'obscurité (phase active). De plus, les souris mutantes ne réussissent pas à maintenir l'éveil. En effet, les épisodes d'éveils individuels sont de plus courte durée chez les souris n'exprimant pas NLGN1, par rapport aux souris de type sauvage. En somme, ces résultats confirment l'hypothèse que les souris n'exprimant pas NLGN1 ne sont pas capables de maintenir l'éveil et passent plus de temps endormies, en SOL en particulier.

De plus, nous avons observé des modifications, non seulement dans la quantité des stades et la durée moyenne des épisodes de sommeil, mais également dans l'activité spectrale mesurée à l'éveil et en sommeil. Effectivement, les souris mutantes pour *Nlgn1* ont une réduction importante de l'activité thêta et alpha pendant la période d'éveil et une augmentation de l'activité delta surtout en début de période de repos et en fin de période active, moments où la pression pour dormir est la plus élevée (Franken et al., 2001). Comme mentionné dans l'introduction, les ondes delta sont un marqueur du processus de récupération du sommeil (Franken et al., 2006). Les variations observées entre souris mutantes et souris de type sauvage sont restreintes à la période d'éveil et de SOL et n'affectent pas le sommeil paradoxal. Ainsi, les résultats confirment l'hypothèse d'une augmentation de la synchronie dans la fréquence delta des souris mutantes pour *Nlgn1*. Nos données suggèrent donc que NLGN1 est requise afin de maintenir la synchronie corticale dans les fréquences thêta/alpha à l'éveil et dans la fréquence delta en SOL. Nous pensons que cette propriété est probablement due au contrôle des R-NMDA réalisé par NLGN1 (Barrow et al., 2009; Jung et al., 2010). Ceci serait probablement dû au fait qu'une absence de NLGN1 engendre une diminution du fonctionnement des R-NMDA qui résulte en une diminution de la synchronisation des neurones dans les fréquences thêta/alpha pendant l'éveil et delta pendant le SOL.

Cependant, l'inhibition joue aussi un rôle important dans la synchronisation neuronale. En effet, plusieurs expériences ont montré un rôle des cellules GABAergiques dans l'activité delta en SOL. Ainsi, lors de l'administration chez le rat de 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-

c)pyridin-3-ol (THIP), agoniste des récepteurs GABA de type A, la durée passée en SOL ainsi que l'activité delta augmentent (Lancel, 1997). De plus, une mutation au niveau des récepteurs GABA de type B les rendant non fonctionnels engendre une diminution de l'activité delta chez les souris mutantes par rapport aux souris de type sauvage (Vienne et al., 2010). D'une manière intéressante, NLGN1A est exprimée au niveau des synapses inhibitrices. Ces données prises ensemble suggèrent, comme mentionné plus haut, que l'augmentation de NLGN1 suite à une privation de sommeil chez la souche AK pourrait être due à une augmentation de NLGN1A spécifiquement. Cette augmentation de NLGN1A aurait lieu en particulier au niveau des synapses inhibitrices en réponse à la privation de sommeil qui se traduit par une augmentation de la synchronisation neuronale. Ceci s'appliquerait particulièrement à la souche AK, souche qui a plus d'ondes lentes que les autres souches de souris, et surtout un rebond d'ondes lentes suite à une privation de sommeil.

Nous avons par la suite évalué si les souris mutantes ont des différences dans certains marqueurs moléculaires de l'EEG, en étudiant l'expression relative des gènes *Homer1a*, *Bdnf* et *Per2*. Comme mentionné dans l'introduction, l'éveil prolongé engendre une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de réponse immédiate et de plasticité (Hairston et al., 2004; Maret et al., 2007; Mongrain et al., 2010) qui pourraient être impliqués dans les voies moléculaires qui sous-tendent le besoin de dormir. Les résultats montrent que ces derniers ne sont pas affectés par la mutation de *Nlgn1*, ceci indiquant que les voies impliquant ces marqueurs ne sont pas affectées par la mutation. Par contre, d'autres voies peuvent être

affectées, telles les voies passant par CamKII (protéine-Kinase  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline dépendante 2), qui sont considérées comme impliquant les R-NMDA (voir section 4.5).

#### **4.5. Régulation moléculaire de NLGN1**

En ce qui concerne la régulation de l'expression de l'ARNm de *Nlgn1*, rien n'est connu. Les résultats de notre article sont les premiers à suggérer un mécanisme de régulation transcriptionnelle de *Nlgn1* impliquant les gènes de l'horloge. En effet, nous montrons que les facteurs de transcription de l'horloge contrôlent l'expression de *Nlgn1* dépendant du temps du jour. De plus, la liaison de ces derniers à *Nlgn1* semble être contrôlée par la pression pour dormir car la privation de sommeil diminue la liaison au gène *Nlgn1*.

Au niveau protéique, nous avons une mauvaise compréhension des mécanismes en jeu qui modulent la synchronie corticale durant l'éveil et le sommeil. Cependant, nos résultats indiquent que NLGN1 semble avoir un rôle dans la régulation du sommeil et de l'éveil chez la souris. Or, une protéine n'a que rarement un effet par elle-même car ses effets sont souvent, voir toujours dus à son interaction avec d'autres protéines. En ce sens, plusieurs études réalisées chez les rongeurs cherchent à comprendre le rôle de NLGN1 dans le fonctionnement du système nerveux central à travers l'étude des partenaires protéiques de NLGN1 et des éléments qui la régulent. Dans ce but, deux articles très intéressants ont été récemment publiés traitant de la régulation moléculaire de NLGN1 en suggérant que cette dernière subit un clivage contrôlant son interaction avec ses protéines partenaires.

Dans la première étude, les auteurs ont observé une diminution de NLGN1 (non clivée) au niveau de la synapse ainsi que de la densité post-synaptique en réponse à une augmentation de l'activité neuronale suite à l'ajout de KCl, induisant ainsi une dépolarisation de la cellule (Peixoto et al., 2012). Dans le but de voir si NLGN1 est clivée à la membrane plasmique, la méthode de biotinylation a été utilisée afin de détecter les fragments N-terminaux de NLGN1 dans le médium de culture. Les résultats ont en effet montré la présence de fragments spécifiques à l'extrémité N-terminale de NLGN1. De même, le fragment représentant l'extrémité N-terminale de NLGN1 augmente suite à l'ajout de NMDA, indiquant qu'une activation des R-NMDA engendre le clivage de NLGN1. Cet effet est inhibé par l'ajout d'un inhibiteur de CaMK, protéine impliquée dans plusieurs voies de signalisation. D'autres études ont aussi montré que l'inhibition chronique des R-NMDA ou de CaMKII bloque l'augmentation de la transmission synaptique médiée par NLGN1 (Chubykin et al., 2007), ceci montrant l'implication de la voie de signalisation CaMK dépendante des R-NMDA dans le fonctionnement de NLGN1. Finalement, dans le but de déterminer quelle enzyme est responsable du clivage de NLGN1, les auteurs ont trouvé que l'ajout d'un inhibiteur de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9) inhibait le clivage extracellulaire de NLGN1, concluant que cette dernière est responsable du clivage observé (Peixoto et al., 2012). Il est à noter que ces résultats ont spécifiquement été observés au niveau des synapses excitatrices, étant donné que les auteurs ont étudié, entre autres, le clivage de NLGN1 suite à une relâche de glutamate, principal neurotransmetteur excitateur. Par la suite, les auteurs ont pu montrer, grâce à une technique de co-expression, que le clivage de NLGN1 déstabilise NRX au niveau

pré-synaptique et affecte probablement la relâche de neurotransmetteur (Peixoto et al., 2012).

En analysant des cultures neuronales, une autre équipe de recherche a aussi trouvé que NLGN1 est clivée au niveau extracellulaire par un autre type de métalloprotéase, ADAM10 (Suzuki et al., 2012). Ces auteurs ont aussi observé un autre type de clivage qui se fait par la  $\gamma$ -secrétase au niveau C-terminal donc intracellulaire. Ils ont par la suite essayé de trouver le domaine de clivage du domaine extracellulaire de NLGN1 et ont trouvé une région protégeant le clivage de NLGN1 ainsi qu'une autre propice au clivage de NLGN1. Le domaine clivé par ADAM10 se situe juste avant le domaine transmembranaire. De plus, les fragments N-terminaux de NLGN1 ont augmenté dans le médium cellulaire suite à l'ajout de NMDA, résultats semblables à ceux observés par Peixoto et al., 2012. Dans cette étude encore, les synapses étudiées sont les synapses excitatrices étant donné que les auteurs ont noté une augmentation de NLGN1 clivée suite à un traitement de glutamate (Suzuki et al., 2012). La même étude a aussi montré que NRX est aussi clivée par les métalloprotéases ainsi que la  $\gamma$ -secrétase, et que l'interaction NLGN1-NRX semble réguler le clivage de NLGN1 (Suzuki et al., 2012). Les auteurs suggèrent que NRX clivée pourrait être un régulateur négatif de NLGN1 en la clivant aussi.

Le clivage de NLGN1 fait partie d'une série de modifications post-traductionnelles que subissent les protéines, telles la glycosylation. Cependant, cette dernière n'est pas qu'une simple modification post-traductionnelle, mais elle survient aussi en réponse à l'activité neuronale (Peixoto et al., 2012). Parallèlement, NLGN1B subit une glycosylation qui est

importante pour le rôle sélectif de NLGN1 au synapses glutamatergiques, étant donné qu'une absence du domaine glycosylé est responsable d'une augmentation du ciblage de NLGN1 aux synapses inhibitrices (Chih et al., 2006). Ceci est particulièrement intéressant à étudier plus en profondeur pour comprendre l'implication de l'insert B dans la régulation de l'éveil et du sommeil étant donné que NLGN1 se lie à NRX par son extrémité N-terminale glycosylée (Chih et al., 2006). Le clivage de NLGN1 semble donc exercer un rôle dans la liaison avec ses partenaires protéiques retrouvés à la synapse. Dans ce cas, une diminution de NLGN1 à la synapse chez la souche B6 suite à la privation de sommeil pourrait être due à un clivage de son extrémité N-terminale et une éventuelle dégradation. Les résultats de nos travaux et de ces deux études récentes pourraient indiquer qu'une augmentation de la pression pour dormir engendre une augmentation du clivage de NLGN1, plus spécifiquement NLGN1 contenant l'insert B, ce qui déstabiliserait le lien NLGN1/NRX et régulerait à la baisse la transmission NMDA-dépendante. Ceci pourrait représenter un mécanisme protecteur en réponse à une augmentation considérable de l'activité neuronale.

#### **4.6. Limites et étapes suivantes**

Bien que notre étude suggère un rôle de NLGN1 dans la régulation de l'éveil et du sommeil, elle possède plusieurs limites. Afin de répondre à ces limites et d'explorer le sujet plus à fond, d'autres études devront être réalisées. Les limites et étapes suivantes du projet seront exposées dans cette section.

Pour commencer, la mutation *Nlgn1* utilisée dans le but d'étudier la régulation de l'éveil et du sommeil des souris est une mutation de KO total ce qui signifie que les souris sont nées, se sont développées, et ont évolué avec la mutation. Par le fait même, des mécanismes compensatoires pourraient prendre le relai et compenser l'effet de la mutation sur la physiologie des systèmes d'éveil et de sommeil. En effet, comme NLGN2 et NLGN3 ont une structure similaire à celle de NLGN1 (Ichtchenko et al., 1996; Bolliger et al., 2008), l'absence de NLGN1 pourrait donc être remplacée par une de ces protéines de la même famille. Ceci est particulièrement vrai pour NLGN3, étant donné que cette dernière se retrouve également au niveau des synapses excitatrices (Budreck & Scheiffele, 2007), tandis que NLGN2 est majoritairement localisée au niveau des synapses inhibitrices (Varoqueaux et al., 2004). De plus, une étude a rapporté qu'une mutation empêchant l'expression de NLGN3 induit une surexpression de NLGN1 (données non publiées discutées dans Chih et al., 2005). Une méthode efficace qui pourrait être utilisée afin d'étudier la contribution de *Nlgn1* à l'éveil et au sommeil chez l'animal adulte normalement développé serait l'utilisation d'un petit-ARN interférant (*small interfering RNA* ou siRNA; Wianny & Zernicka-Goetz, 2000) tel le petit-ARN en épingle (*small hairpin RNA* ou shRNA; Chih et al., 2005; Kwon et al., 2012), permettant de réprimer l'expression de *Nlgn1*. Ceci préviendrait les effets compensatoires d'autres molécules. Ce projet est en développement dans notre laboratoire.

Chez les souris privées de sommeil, l'expression d'ARN ainsi que de protéine NLGN1 change par rapport aux souris en condition normale. Il sera aussi intéressant de voir si ce changement est accompagné par un changement au niveau de NLGN2 ainsi que de NLGN3.



Des résultats d'expériences préliminaires que j'ai effectuées avec les mêmes échantillons que ceux utilisés pour étudier l'effet de la privation de sommeil sur NLGN1 ont montré qu'il n'y a pas de changement au niveau de la quantité de NLGN2 dans la fraction synaptoneurosomale antérieure chez les souches B6 et AK. Ceci pourrait suggérer que NLGN2 n'est probablement pas impliquée dans la régulation de la pression pour dormir. La prochaine étape serait donc d'étudier l'expression de NLGN3, qui pourrait être régulée suite à un changement au niveau de NLGN1 étant donné qu'elle est aussi localisée aux synapses excitatrices. Comme NLGN1 avec insert B est spécifiquement impliquée dans la régulation des R-NMDA et que cet insert n'est pas présent dans NLGN3, il est aussi bien probable qu'il n'y ait pas de compensation de la part de NLGN3 non plus. Ceci a été récemment testé par une équipe qui a mesuré l'effet d'une diminution des niveaux NLGN1 sur les niveaux de NLGN2 et NLGN3 et n'a pas trouvé de changement (Kwon et al., 2012).

Une autre limite importante de notre étude est que nous n'avons pas mesuré l'effet de la privation sommeil sur les ondes lentes chez les souris mutantes pour *Nlgn1*. Nous avons étudié le rôle d'une augmentation de la pression de sommeil sur l'expression d'ARNm ainsi que de protéines chez des souris de type sauvage, ainsi que les conséquences d'une mutation au niveau du gène *Nlgn1* sur le sommeil des souris. Le fait d'étudier l'influence d'une mutation de *Nlgn1* sur l'augmentation de la pression pour dormir est très intéressant puisque ça nous permettrait de vérifier si l'absence de NLGN1 résulte en 1) une augmentation de l'AOL après une privation de sommeil, et 2) une réponse altérée de l'AOL comparativement à celle des souris de type sauvage. De plus, les résultats obtenus

permettraient de comparer les données des marqueurs moléculaires aux données électrophysiologiques caractérisant le sommeil des souris suite à une privation de sommeil. Cette expérience est présentement en cours d'analyse dans notre laboratoire. Étant donné que l'absence de NLGN1 engendre une plus grande AOL en conditions de base, nous anticipons plus d'AOL suite à une privation de sommeil chez les souris mutantes.

Il serait aussi intéressant d'étudier les changements au niveau des ondes lentes individuelles qui sont également modulées par la pression homéostatique pour dormir. En effet, chez les rongeurs, au début de la période de repos ou suite à une privation de sommeil, les phases de dépolarisation cellulaire sont courtes et alternées avec de longues périodes de silence (Vyazovskiy et al., 2009). Pour les souris mutantes pour *Nlgn1*, les phases de dépolarisation devraient être très courtes et il devrait y avoir beaucoup de périodes de silence de longue durée.

NLGN1 n'est qu'une des nombreuses molécules d'adhésion synaptique présentes à la synapse, et plusieurs autres peuvent avoir un effet sur le sommeil et l'éveil (telles les métalloprotéases de la matrice; Wright et al., 2002). Il est donc important d'étudier, d'un côté, l'effet de la privation de sommeil sur la liaison de NLGN1 à ses partenaires protéiques (PSD-95, R-NMDA; Song et al., 1999; Barrow et al., 2009), et d'un autre côté, de s'intéresser à d'autres molécules d'adhésion synaptique impliquées dans la plasticité. Une de ces autres molécules est EPHA4, qui est aussi étudiée dans notre laboratoire, et qui semble également avoir un rôle dans la régulation du sommeil et de l'éveil chez la souris (les souris mutantes pour *Epha4* semblent être plus éveillées). Ainsi, cette molécule d'adhésion synaptique

pourrait également avoir un rôle dans l'association entre l'équilibre synaptique et la régulation de l'éveil et du sommeil. De plus, EPHA4 semble également être clivé par la  $\gamma$ -secrétase (Inoue et al., 2009), et pourrait donc contribuer aussi à la stabilité synaptique et à la qualité de l'éveil et du sommeil.

Finalement, NLGN1 est surtout exprimée dans le cortex ainsi que dans l'hippocampe (Song et al., 1999; *Allen Institute for brain science, mouse brain atlas*). Il serait donc intéressant d'étudier les changements spécifiques au niveau des différentes régions du cerveau. Dans notre étude, les régions utilisées sont définies assez grossièrement (antérieure vs. postérieure), ce qui présente une limite à l'étude. Or, nous avons quand même observé que les effets sont dans la partie antérieure spécifiquement, qui contient essentiellement du cortex et le striatum. La prochaine étape consiste à évaluer avec plus de précision topographique l'effet d'une privation de sommeil sur l'expression de l'ARNm ainsi que protéique NLGN1. Dans le cadre de mes travaux, j'ai pu effectuer la même technique d'extraction synaptoneurosomale que celle utilisée dans l'article afin de quantifier NLGN1 dans différentes parties du cerveau de souris privées ou pas de sommeil : le cortex (en totalité), l'hippocampe et l'hypothalamus/thalamus. Malheureusement, les résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de changement suite à une privation de sommeil au niveau de la région corticale et de l'hippocampe (données non illustrées). La prochaine étape serait d'étudier les mêmes structures en faisant une extraction au niveau de la densité post-synaptique, étant donné que NLGN1 est surtout exprimée à la densité post-synaptique (Song et al., 1999) et que la fraction obtenue serait donc enrichie en NLGN1.

Il serait aussi intéressant d'étudier la variation de l'ARNm aussi au niveau de différentes régions du cerveau, en étudiant l'expression de chacun des variants de transcription. Dans ce contexte, une technique par hybridation in situ pourrait s'avérer des plus adaptées. Une autre étape importante à faire serait l'étude de la localisation cellulaire des changements protéiques par immunohistochimie. Cette technique pourrait également au préalable, donner une analyse plus détaillée de la topographie des changements. Or, nous sommes ici limités par le fait qu'il n'existe pas d'anticorps pour anti-NLGN1 qui fonctionne en immunohistochimie (observation également réalisée par Peixoto et al., 2012) et donc, pour la protéine, une approche par dissection ou par technique du "punch" de tissus sont à privilégier.

#### **4.7. Perspectives et liens avec maladies mentales**

Les résultats des différentes expériences réalisées suggèrent un rôle de NLGN1 dans la régulation de l'éveil et du sommeil. Notre étude nous permet de proposer un modèle de l'implication de *Nlgn1* dans la plasticité synaptique : une augmentation de la pression pour dormir (ou de la durée ou de la qualité de l'éveil) est accompagnée d'une augmentation de l'activité neuronale, ce qui engendre, d'une part une diminution de l'expression de l'ARNm de *Nlgn1* avec insert B et, d'autre part, un clivage de NLGN1 protéique. La diminution de NLGN1B, en particulier, résulte en une diminution de l'activité des R-NMDA. Ceci peut avoir des conséquences sur le maintien de l'éveil aussi bien qu'au niveau du sommeil, tel une diminution de la cognition et une augmentation de la synchronie dans le delta. Ainsi, les

conséquences de mutations affectant la famille des NLGN sur la cognition et les liens avec les troubles psychiatriques seront discutées dans cette section.

Pour commencer, des souris ayant une mutation au niveau du gène *Shank2* leur donnant un phénotype ressemblant à celui des patients autistes ont une diminution de la fonction des R-NMDA, et voient leurs symptômes autistiques disparaître (amélioration des interactions sociales) lors de la restauration des R-NMDA en administrant un agoniste partiel des R-NMDA (Won et al., 2012). Ces évidences soulignent l'importance d'une régulation adéquate des R-NMDA afin d'assurer un bon fonctionnement synaptique, et ainsi un cerveau sain.

Comme le lien NLGN1-NRX semble requis pour une bonne stabilisation synaptique (Chen et al., 2010), une mutation de l'une ou de l'autre de ces protéines peut engendrer des conséquences négatives sur la transmission synaptique dans le cerveau. Par exemple, chez les humains, des mutations des NRX ont été observées chez des patients ayant des troubles cognitifs tels les patients autistes (Révision par Südhof, 2008). De plus, chez les patients autistes, on observe une altération du ratio excitation/inhibition au niveau des synapses (Révision par Rubenstein & Merzenich, 2003), qui peut être dû à une dérégulation au niveau des NLGN étant donné qu'une mutation de *Nlgn1*, par exemple, altère également le ratio excitation/inhibition. Plusieurs études ont en effet identifié, chez des populations de patients autistes, des mutations des gènes *Nlgn3* et *Nlgn4* (Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004). Ceci constitue une évidence additionnelle concernant l'importance des NLGN pour le bon fonctionnement du cerveau (Chih et al., 2004).

Une des premières études supportant un rôle de *Nlgn1* dans le fonctionnement de la transmission synaptique a été publiée en 2007. Celle-ci montre que la fonction des synapses excitatrices est inhibée dans les neurones mutants pour *Nlgn1* (Chubykin et al, 2007). D'autres recherches ont montré par la suite que les souris mutantes pour *Nlgn1* ont des problèmes d'apprentissage et de mémoire spatiale ainsi que des comportements répétitifs observés chez les patients autistes et des problèmes d'interaction sociale (Blundell et al., 2010), comme ce que nous observons aussi. De façon intéressante, la même équipe de recherche a montré que ces comportements disparaissent lors de l'administration d'un agoniste partiel des R-NMDA (Blundell et al., 2010), suggérant un rôle de NLGN1 ainsi que des R-NMDA dans le fonctionnement synaptique, dont la dérégulation peut mener à des troubles mentaux tels l'autisme. De plus, une étude récente a montré qu'une normalisation de l'expression de NLGN1 peut rétablir le ratio synaptique excitation/inhibition ainsi que les déficits de comportement social détectés chez des souris (Gkogkas et al., 2012).

Les patients autistes présentent dans la majorité des cas des troubles importants de sommeil. Les troubles les plus rapportés sont une augmentation de la latence pour s'endormir, un sommeil fragmenté, un réveil précoce et un temps de sommeil total réduit (Miano et al., 2007; Souders et al., 2009). Un trouble de la régulation circadienne du sommeil a aussi été proposé (révisé dans Kotagal & Broomall, 2012). Le fait que la famille des NLGN soit associée au trouble autistique (Jamain et al., 2003; Laumonier et al., 2004) et que NLGN1 soit impliquée dans les fonctions cognitives (Blundell et al., 2010) est très intéressant. De plus, NLGN1 pourrait possiblement faire directement partie des mécanismes

moléculaires en cause dans les troubles du sommeil observé chez les autistes. Ainsi, nos résultats supportent qu'une mutation de *Nlgn1* pourrait avoir des conséquences délétères sur la cognition aussi bien que sur le sommeil, ce qui fait partie du portrait clinique des patients autistes. En terminant, il faut souligner que les problèmes de sommeil pourraient eux-mêmes être responsables de certains problèmes cognitifs et d'intégration sociale des patients (Taylor et al., 2012), ce qui fait de *Nlgn1* une piste des plus pertinentes à poursuivre.

#### **4.8 Conclusion**

Les résultats de mes travaux de maîtrise et de notre article soulignent un rôle de NLGN1 dans la régulation de l'éveil et du sommeil par des études chez la souris. Ce rôle semble impliquer différents mécanismes moléculaires agissant notamment au niveau de la transcription et de la régulation protéique en fonction de l'activité neuronale. En résumé, nous proposons que l'éveil prolongé régule négativement NLGN1 contenant un insert B, ce qui affecte le fonctionnement de la synapse glutamatergique engendrant une altération au niveau de la synchronie corticale dans le domaine des ondes thêta/alpha à l'éveil et delta en sommeil. Dans le futur, une meilleure compréhension des cascades impliquées dans la régulation de NLGN1 à travers l'étude de l'influence des différents partenaires de NLGN1 nous permettra d'ajouter des éléments manquants à notre modèle.

## **Bibliographie**

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M (1998) *A mutant Drosophila homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless*. Cell 93(5):791–804.

Allen institute for brain science mouse brain atlas: <http://mouse.brain-map.org/atlas/index.html>.

Altman J & Das GD (1965) *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol 124(3), 319–335.

Aton SJ, et al. (2009) *Mechanisms of sleep-dependent consolidation of cortical plasticity*. Neuron 61(3):454–466.

Barrow SL, et al. (2009) *Neurologin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis*. Neural Dev 4:17.

Bartos M, Vida I, Jonas P (2007) *Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks*. Nat Rev Neurosci 8(1):45-56.

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



Berntson GG, Shafi R, Sarter M (2002) *Specific contributions of the basal forebrain corticopetal cholinergic system to electroencephalographic activity and sleep/waking behaviour.* Eur J Neurosci 16(12):2453–2461.

Bersagliere A & Achermann P (2010) *Slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep electroencephalogram: effects of increased sleep pressure.* J Sleep Res 19(1 Pt 2):228–237.

Binder S, Baier PC, Mölle M, Inostroza M, Born J, Marshall L (2012) *Sleep enhances memory consolidation in the hippocampus-dependent object-place recognition task in rats.* Neurobiol Learn Mem 97(2):213–219.

Bjorness TE, Riley BT, Tysor MK, Poe GR (2005) *REM restriction persistently alters strategy used to solve a spatial task.* Learn Mem 12(3):352–359.

Blundell J, et al. (2010) *Neurologin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior.* J Neurosci 30(6):2115-2129.

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

Bolliger MF, Pei J, Maxeiner S, Boucard AA, Grishin NV, Südhof TC (2008) *Unusually rapid evolution of Neurologin-4 in mice.* Proc Natl Acad Sci USA 105(17):6421–6426.

Borbély AA (1982) *A two process model of sleep regulation.* Human Neurobiol 1:195-204.

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

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

Budreck EC & Scheiffele P (2007) *Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses.* *Eur J Neurosci* 26(7):1738-1748.

Bushey D, Tononi G, Cirelli C (2011) *Sleep and synaptic homeostasis: structural evidence in Drosophila.* *Science* 332(6037) 1576–1581.

Campbell IG, Guinan MJ, Horowitz JM (2002) *Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices.* *J Neurophysiol* 88(2):1073-1076.

Cape EG & Jones BE (2000) *Effects of glutamate agonist versus procaine microinjections into the basal forebrain cholinergic cell area upon gamma and theta EEG activity and sleep-wake state.* *Eur J Neurosci* 12(6):2166-2184.

Carroll RC & Zukin RS (2002) *NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity.* *Trends Neurosci* 25(11):571–577.

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

Chen SX, Tari PK, She K, Haas K (2010) *Neurexin-neuroigin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo*. *Neuron* 67(6):967–983.

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

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

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

Chowdhury A, Chandra R, Jha SK (2011) Total sleep deprivation impairs the encoding of trace-conditioned memory in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 95(3):355-360.

Chubykin AA, et al. (2007) *Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2*. *Neuron* 54(6):919-931.

Cirelli C, & Tononi G (2000a) Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J Neurosci* 20(24):9187–9194.

Cirelli C, Tononi G (2000b) *On the functional significance of c-fos induction during the sleep/waking cycle*. *Sleep* 23:453– 469.

Curie T, Mongrain V, Dorsaz S, Emmenegger Y, Franken P (2011) *PERIOD-2 integrates both circadian and homeostatic aspects of sleep regulation*. 3<sup>rd</sup> World Chronobiology Conference (WCC, Puebla de Zaragoza, Mexico), P050, page 168.

Daan S, Beersma DG, Borbély AA (1984) *Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker*. Am J Physiol 246(2 Pt 2):R161-R183.

Dahlhaus et al., (2010). *Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus*. Hippocampus 20(2):305-322.

Darlington TK, et al. (1998) *Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim*. Science 280(5369):1599–1603.

Dijk DJ, Hayes B, Czeisler CA (1993) *Dynamics of electroencephalographic sleep spindles and slow wave activity in men: effect of sleep deprivation*. Brain Res 626:190-199.

Dijk DJ, Czeisler CA (1994) *Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans*. Neurosci Lett 166:63-68.

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

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) *The glutamate receptor ion channels*. Pharmacol Rev 51(1):7–61.

Donlea JM, Thimgan MS, Suzuki Y, Gottschalk L, Shaw PJ (2011) *Inducing sleep by remote control facilitates memory consolidation in Drosophila*. *Science* 332(6037) 1571–1576.

Everson CA, Thalacker CD, Hogg N (2008) *Phagocyte migration and cellular stress induced in liver, lung, and intestine during sleep loss and sleep recovery*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(6):R2067–2074.

Faraguna U, Vyazovskiy VV, Nelson AB, Tononi G, Cirelli C (2008) *A causal role for brain-derived neurotrophic factor in the homeostatic regulation of sleep*. *J Neurosci* 28(15):4088–4095.

Faulhaber J, Steiger A, Lancel M (1997). *The GABAA agonist THIP produces slow wave sleep and reduces spindling activity in NREM sleep in humans*. *Psychopharmacology (Berl)* 130(3):285-291.

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

Flohr H (1995) *An information processing theory of anaesthesia*. *Neuropsychologia* 33(9):1169–1180.

Fortin DA et al. (2012) *Brain-derived neurotrophic factor activation CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors*. *J Neurosci* 32(24):8127-8137.

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

Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbély AA (1991) *Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature.* Am J Physiol 261(1 Pt 2):R198-R208.

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

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

Franken P, et al. (2006) *NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: Genotype and sex interactions.* Proc Natl Acad Sci USA 103:7118-7123.

Franken P, Thomason R, Heller HC, O'Hara BF (2007) *A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: a strain comparison.* BMC Neuroscience 8:87.

Gilestro GF, Tononi G, Cirelli C (2009) *Widespread changes in synaptic markers as function of sleep and wakefulness in Drosophila.* Science 324(5923):109-112.

Gkogkas CG et al. (2012) *Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control.* Nature 11628.

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

Gonzalez-Burgos G & Lewis DA (2008) GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 34(5):944-961.

Graf ER, Zhang X, Jin S-X, Linhoff MW, Craig AM (2004) *Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins*. *Cell* 119(7):1013–1026.

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

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) *Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268*. *J Neurosci* 21(4):5089-5098.

Hairston IS et al. (2004) *Sleep deprivation effects on growth factor expression in neonatal rats: a potential role for BDNF in the mediation of delta power*. *J Neurophysiol* 91(4):1586–1595.

Hasan S, Dauvilliers Y, Mongrain V, Franken P, Tafti, M (2012) *Age-related changes in sleep in inbred mice are genotype dependent*. *Neurobiol Aging* 33(1):195e13–26.

Hastings MH & Herzog ED (2004) *Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei*. *J Biol Rhythms* 19(5):400–413.

Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) *The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region*. Proc Natl Acad Sci USA 93(12):6031–6036.

Huber R, Deboer T, Tobler I (2000) *Effects of sleep deprivation on sleep and sleep EEG in three mouse strains: empirical data and simulations*. Brain Res 857(1-2):8-19.

Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G (2004) *Local sleep and learning*. Nature 430:78-81.

Huber R, Tononi G, Cirelli C (2007) *Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis*. Sleep 30(2):129-139.

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

Ichtchenko K, Nguyen T, Südhof TC (1996) *Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins*. J Biol Chemistry 271(5):2676-2682.

Inoue E et al. (2009) *Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation*. J Cell Biol 185(3):551–564.

Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC (1996) *Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans*. FASEB J 10(5):643–653.



Jamain S et al. (2003) *Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism*. Nat Genet 34(1):27-29.

Jenni OG, Achermann P, Carskadon MA (2005) *Homeostatic sleep regulation in adolescents*. Sleep 28(11):1446–1454.

Joo EY, Yoon CW, Koo DL, Kim D, Hong SB (2012) *Adverse effects of 24 hours of sleep deprivation on cognition and stress hormones*. J Clin Neurol 8(2):146–150.

Jung SY et al. (2010) *Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors*. PNAS 107(10):4710-4715.

Kim J, et al. (2008) *Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals*. Proc Natl Acad Sci USA 105(26):9087-9092.

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

Kotagal S & Broomall E (2012) *Sleep in children with autism spectrum disorder*. Pediatr Neurol 47(4):242–251.

Kumar T & Jha SK (2012) *Sleep deprivation impairs consolidation of cued fear memory in rats*. PLoS ONE 7(10):e47042.

Kume K et al. (1999) *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop*. Cell 98(2):193–205.

Kwon H-B et al. (2012) *Neuroigin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number*. Nat Neurosci 15(12):1667–1674.

Lancel M (1997) The GABA(A) agonist THIP increases non-REM sleep and enhances non-REM sleep-specific delta activity in the rat during the dark period. Sleep 20(12):1099-1104.

Landsness EC et al (2009) Sleep-dependent improvement in visuomotor learning: a causal role for slow waves. Sleep 32(10):1273-1284.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) *Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit*. Neuron 18(3):493–503.

Laudes T, Meis S, Munsch T, Lessmann V (2012) Impaired transmission at coricothalamic excitatory inputs and intrathalamic GABAergic synapses in the ventrobasal thalamus of heterozygous BDNF knockout mice. Neuroscience 222:215-227.

Laumonier F al. (2004) *X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family*. Am J Hum Genet 74(3):552–557.

Lee H, Dean C, Isacoff E (2010) *Alternative splicing of neuroligin regulates the rate of presynaptic differentiation*. J Neurosci 30(34):11435–11446.

Lincoln G, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg D (2002) *Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer*. Proc Natl Acad Sci USA 99(21):13890–13895.

Liu ZW, Faraguna U, Cirelli C, Tononi G, Gao XB (2010) *Direct evidence for wake-related increases and sleep-related decreases in synaptic strength in rodent cortex*. J Neurosci 30(25) 8671–8675.

Llinás RR & Steriade M (2006) *Bursting of thalamic neurons and states of vigilance*. J Neurophysiol 95(6):3297–3308.

Luppi PH et al. (2011) *The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder*. Sleep Med Rev 15(3), 153-163.

Maret S, et al. (2007) *Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss*. Proc Natl Acad Sci USA 104(50):20090-20095.

Maret S, Faraguna U, Nelson AB, Cirelli C, Tononi G (2011) *Sleep and waking modulate spine turnover in the adolescent mouse cortex*. Nat Neurosci 14(11) 1418-1420.

McCarley RW (2007) *Neurobiology of REM and NREM sleep*. Sleep Med 8(4):302–330.

McDermott CM, Hardy MN, Bazan NG, Magee JC (2006) *Sleep deprivation-induced alterations in excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus*. J Physiol 570(Pt 3):553-565.

Miano S et al. (2007) *Sleep in children with autistic spectrum disorder: a questionnaire and polysomnographic study*. *Sleep Med* 9(1):64–70.

Mongrain V, Franken P. *Genetic interaction between circadian and homeostatic regulation of sleep*. In *The genetic basis of sleep and sleep disorders*, eds. Shaw P, Tafti N, Thorpy M (Cambridge University Press, Cambridge), chapter 17 (accepted 2012/09/24).

Mongrain V, et al. (2010) *Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis*. *Sleep* 33(9):1147-1157.

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

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

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

Mothet JP et al. (2000) *D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(9):4926–4931.

Naidoo N et al. (2012) *Role of Homer proteins in the maintenance of sleep-wake states*. PLoS ONE 7(4):e35174.

Nam CI & Chen L (2005) *Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroigin interaction and neurotransmitter*. Proc Natl Acad Sci USA 102(17):6137–6142.

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

Nguyen T & Südhof TC (1997) Binding properties of neuroigin 1 and neurexin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. J Biol Chem 272(41) :26032-26039.

Peixoto RT, et al. (2012) *Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroigin-1*. Neuron 76(2):396-409.

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

Rempe MJ, Best J, Terman D (2010) *A mathematical model of the sleep/wake cycle*. J Math Biol 60(5):615–644.

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

Rozov A, Zivkovic AR, Schwarz MK (2012) Homer1 gene products orchestrate Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptor distribution and LTP expression. Front Synaptic Neurosci 4:4.

Rubenstein JL & Merzenich MM (2003) *Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems*. Genes Brain Behav 2(5):255-267.

Sala C et al. (2003) Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. J Neurosci 23(15):6327-6337.

Samuels ER & Szabadi E (2008) *Functional neuroanatomy of the adrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation*. Curr Neuropharmacol 6(3):235-253.

Sangoram AM et al. (1998) *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription*. Neuron 21(5):1101–1113.

Saper CB, Fuller PM, Pederson NP, Lu J, Scammell TE (2010) Sleep state switching. Neuron 68(6), 1023-1042.

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

Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Born J, Schultes B (2008) *A single night of sleep deprivation increases ghrelin levels and feelings of hunger in normal-weight healthy men*. J Sleep Res 17(3):331-334.

Schnell E, Bensen AL, Washburn EK, Westbrook GL (2012) *Neurologin-1 overexpression in newborn granule cells in vivo*. PLoS One 7(10):e48045.

Semba K (2000) *Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance*. Behav Brain Res 115(2):117–141.

Shipman SL & Nicoll RA (2012) *A subtype-specific function for the extracellular domain of neuroligin 1 in hippocampal LTP*. Neuron 76(2):309–316.

Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N (1999) *Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses*. Proc Natl Acad Sci USA 96(3):1100-1105.

Souders MC et al. (2009) *Sleep behaviors and sleep quality in children with autism spectrum disorders*. Sleep 32(12):1566–1578.

Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E (1999) *Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function*. Lancet 354(9188):1435–1439.

Steigerwald F, Schulz TW, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH, Köhr G (2000) *C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors*. J Neurosci 20(12):4573–4581.

Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC (1990) *Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems*. J Neurosci 10(8):2541-2559.

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

Steriade M (2000) *Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation*. Neuroscience 101(2):243-276.

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

Stickgold R (2005) Sleep-dependant memory consolidation. Nature 437(7063):1272-1278.

Südhof TC (2008) *Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease*. Nature 455(7215):903-911.

Suzuki K, et al. (2012) *Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1*. Neuron 76(2):410-422.

Taylor MA, Schreck KA, Mulick JA (2012) *Sleep disruption as a correlate to cognitive and adaptive behavior problems in autism spectrum disorders*. Res Dev Disabil 33(5):1408–1417.

Tegnér J, Compte A, Wang XJ (2002) *The dynamical stability of reverberatory neural circuits*. Biol Cybern 87(5-6):471-481.

Tobler I & Borbély AA (1986) *Sleep EEG in the rat as a function of prior waking*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 64(1):74-76.

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

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



Van Der Werf YD, Altena E, Vis JC, Koene T, Van Someren EJ (2011) Reduction of nocturnal slow-wave activity affects daytime vigilance lapses and memory encoding, but not reaction time or implicit learning. *Prog Brain Res* 193:245-255.

Vanini G, Lydic R, Baghdoyan HA (2012) *GABA-to-ACh ratio in basal forebrain and cerebral cortex varies significantly during sleep*. *Sleep* 35(10):1325–1334.

Varoquaux F, Jamain S, Brose N (2004) *Neuroigin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses*. *Eur J Cell Biol* 83(9):449–456.

Varoquaux F, et al. (2006) *Neuroligins determine synapse maturation and function*. *Neuron* 51(6):741-754.

Vienne J, Bettler B, Franken P, Tafti M (2010) Differential effects of GABAB receptor subtypes,  $\gamma$ -hydroxybutyric Acid, and Baclofen on EEG activity and sleep regulation. *J Neurosci* 30(42):14194-14204.

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

Vyazovskiy VV, et al. (2009) *Cortical firing and sleep homeostasis*. *Neuron* 63(6):865-878.  
*Neuron* 54(6):919-931.

Walker MP & Stickgold R (2004) Sleep, memory and plasticity. *Annu Rev Psychol* 57:139-166.

Waterhouse et al. (2012) BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci* 32(41):14318-14330.

Wianny F & Zernicka-Goetz M (2000) *Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development*. *Nat Cell Biol* 2(2):70–75.

Wigren HK, Schepens M, Matto V, Stenberg D, Porkka-Heiskanen T (2007) *Glutamatergic stimulation of the basal forebrain elevates extracellular adenosine and increases the subsequent sleep*. *Neuroscience* 147(3):811-823.

Williams JM, Guévremont D, Mason-Parker SE, Luxmanan C, Tate WP, Abraham WC (2007) *Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors during long-term potentiation in awake adult animals*. *J Neurosci* 27(51):14171-14178.

Wisor JP et al. (2002) *A role for cryptochromes in sleep regulation*. *BMC Neurosci* 3:20.

Wolosker H (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. *Mol Neurobiol* 36(2):152-164.

Won H et al. (2012) *Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function*. *Nature* 486(7402):261–265.

Wright JW, Reichert JR, Davis CJ, Harding JW (2002) *Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system*. *Neurosci Biobehav Rev* 26(5):529–552.

Yoshida K, McCormack S, España RA, Crocker A, Scammell TE (2006) Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494(5):845-861.

Zeidan A & Ziv NE (2012) *Neuroigin-1 loss is associated with reduced tenacity of excitatory synapses*. PLoS One 7(7):e42314.