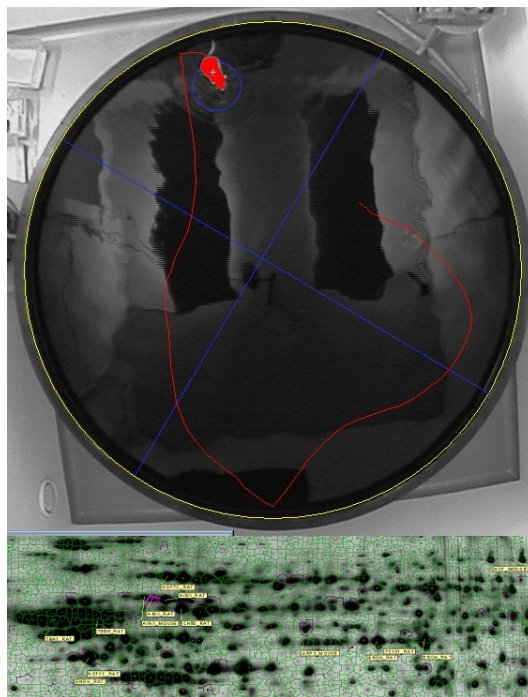


Centre de Neurobiologie cellulaire et moléculaire
& Centre de Recherches du Cyclotron
Faculté de Médecine
Université de Liège

EFFETS DU SOMMEIL ET DE LA
PRIVATION DE SOMMEIL SUR LE
PROTÉOME HIPPOCAMPIQUE DE RAT
APRÈS APPRENTISSAGE TOPOGRAPHIQUE



Thèse présentée par
JEAN-ETIENNE POIRRIER
en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales
Année académique 2009-2010

© Jean-Etienne Poirrier et l'Université de Liège, Faculté de Médecine
Avenue de l'Hôpital, 1 (Bât. B36), B-4000 Liège (Belgium) – Janvier 2010

Jean-Etienne Poirrier : *Effets du sommeil et de la privation de sommeil sur le protéome hippocampique de rat après apprentissage topographique*, Doctorat en Sciences biomédicales

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.3 or any later version published by the Free Software Foundation ; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts. A copy of the license can be found at <http://www.gnu.org/licenses/fdl-1.3-standalone.html>.

REMERCIEMENTS

C'est avec mon enthousiasme le plus vif et aussi le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui, à leur manière, m'ont aidé à mener à bien cette thèse.

Tout d'abord, ma profonde gratitude s'adresse aux personnes qui m'ont proposé ce sujet de thèse et qui m'ont encadré tout au long de ces années d'étude : les Drs. Pierre Leprince et Pierre Maquet. Au travers de nos discussions, ils m'ont apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet. Je salue aussi la disponibilité, la souplesse, l'ouverture d'esprit et surtout la connaissance du sujet de mes directeurs de thèse qui ont su également me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à MM. les professeurs André Luxen et Gustave Moonen qui m'ont fait l'honneur de m'accueillir dans leurs laboratoires respectifs, le Centre de Recherches du Cyclotron et le Centre de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, ainsi que pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont ils ont toujours fait preuve.

Je remercie également le professeur Carlyle T. Smith (University of Trent, Canada) pour ses généreuses explications, sa patience ainsi que son enthousiasme communicatif. Cette thèse lui doit son impulsion initiale.

J'adresse aussi ma gratitude au professeur Pierre-Hervé Luppi (Université de Lyon, France) et au docteur Romain Goutagny pour les quelques jours très instructifs dans leur laboratoire. Travailler avec les successeurs de Michel Jouvet, à quelques mètres des locaux où a été "découvert" le sommeil paradoxal, a été une expérience exceptionnelle dans ma vie de jeune chercheur.

Si la recherche s'effectue dans un laboratoire, elle s'enrichit d'échanges formels et informels lors de congrès et bénéficie de l'extraordinaire collaboration présente dans le monde scientifique. C'est aussi grâce aux discussions, visites de laboratoires et autres échanges avec les professeurs Peter De Deyn (Universiteit Antwerpen), Richard G. Morris (University of Edinburgh, UK), Peter Meerlo et Arjen M. Strijkstra (Groningen Universiteit, Pays-Bas) que cette thèse a vu le jour. J'inclus également Claude Robert (Université de Paris V, France) pour son support et son aide concernant les enregistrements de sommeil de rats.

Plus proche de nous, deux laboratoires m'ont été d'une aide précieuse dans l'avancement de mes recherches. Je souhaite ainsi remercier les membres du "Centre d'étude des troubles de l'éveil et du sommeil" du CHU de Liège, tant pour leur matériel que pour leur support scientifique et technique constant, et plus particulièrement le professeur Robert Poirrier mais aussi Laurent Cambron et Jean-Marc Klein. Et j'ai

pu grandement apprécier les collaborations entreprises avec le laboratoire de Microélectronique et Microsystèmes du professeur Jacques Destiné concernant les projets de télémétrie. Que Frédéric Senny, Nicolas Marique, Thibaut Libert se voient ici remerciés pour leur travail acharné. Un dernier ingénieur (mais non des moindres!) reçoit également toute mon estime pour son exceptionnel travail sur Gemvid : Laurent Poirrier.

Bien qu'un seul nom figure sur la couverture d'une thèse, son contenu n'est rendu possible que par la collaboration et l'aide souvent extraordinaire de nombreuses autres personnes dans les deux laboratoires. Je voudrais ainsi souligner combien l'aide des Dr. Alessandro Silvani (Università di Bologna, Italy) et Annabelle Darsaud m'a été précieuse dans la mise au point des opérations sur les rat, des enregistrements de sommeil ainsi que son analyse. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux Drs. Joel Aerts et Alain Plenevaux. Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans les dons d'ingénierie (et d'humour!) de Damien Lassance, sans ceux d'électrophorèse de Patricia Piscicelli, Yael Dohogne et Laurence Confetti, sans ceux de dissection d'hippocampe de rats nouveaux-nés de Patricia Ernst, sans la patience d'Arlette Brose lorsqu'on s'est mis en tête de trouver les barrel cortices, sans la dextérité en spectrométrie de masse des Drs. François Guillonnet et Jenny Renault (CRP Gabriel Lippmann, Luxembourg) ainsi que sans la gentillesse et le support administratif d'Annick Plenevaux, Brigitte Herbillon et Annette Konings.

Finalement, je remercie sincèrement le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA), le Fonds Léon Fredericq ainsi que la Belgian Association for Sleep Research and Sleep Medicine pour leur soutien financier.

Ce doctorat n'aurait jamais vu le jour sans le soutien de mon extraordinaire famille, mon épouse et mon fils. Il m'est impossible d'exprimer en quelques mots combien je leur suis reconnaissant, aussi je ne le tenterai même pas. Je leur dis simplement : merci !

Jean-Etienne Poirrier
Janvier 2009

ABSTRACT

One of the hypothesis regarding the function of sleep suggests that the latter could allow neuronal plasticity and the organisation (or re-organisation) of synapses, phenomena underlying cognitive functions. Specific disturbances of sleep following a learning session showed a significant decrease in performances at the level of genes and behaviour. Our work aimed at studying the consequences of sleep deprivation following a learning session, involving a memory task, at the level of protein abundancy in the rat hippocampus. In this respect, a first proteomic study of the rat hippocampus in the absence of any specific learning was undertaken ; this study showed the absence of quantitative difference in protein abundance between left and right hippocampi. In a second proteomic study, we showed that a short-term sleep deprivation affects different protein networks, those mainly linked with the cellular metabolism and the biochemical pathways of energy, transport, vesicular trafficking, cytoskeleton and protein processing. Finally, a third proteomic study shows the effects of learning a spatial task in the beginning of the diurnal activity period on the rat hippocampus proteome. The proteins principally affected here, have functions related to cellular metabolism and the cytoskeleton.

Keywords : sleep, deprivation, cognition, Morris water maze, memory, proteomics, lateratisation, stress.

RÉSUMÉ

Une des hypothèses concernant la fonction du sommeil suggère que ce dernier permettrait la plasticité neuronale et l'organisation (ou la réorganisation) synaptique, phénomènes sous-tendant des fonctions cognitives. Des perturbations spécifiques du sommeil faisant suite à un apprentissage ont en effet montré une diminution significative des performances aux niveaux des gènes et du comportement. Notre travail a visé à étudier les conséquences d'une privation de sommeil faisant suite à un apprentissage d'une tâche mnésique au niveau de l'abondance de protéines dans l'hippocampe de rat. Pour ce faire, une première étude protéomique de l'hippocampe de rat en l'absence d'apprentissage spatial spécifique a d'abord été réalisée ; elle montre l'absence de différence quantitative d'abondance protéique entre les hippocampes gauche et droit. Ensuite, une seconde étude protéomique montre qu'une privation de courte durée affecte différents réseaux de protéines, principalement liés au métabolisme cellulaire, aux voies biochimiques de l'énergie, des transports, du trafic vésiculaire, du

cytosquelette et du traitement des protéines dans l'hippocampe de rat. Finalement, une troisième étude protéomique montre les effets d'un apprentissage d'une tâche spatiale en début de période d'activité diurne sur le protéome d'hippocampe de rat. Les principales protéines affectées ont ici des fonctions liées au métabolisme cellulaire et au cytosquelette.

Mots clés : sommeil, privation, cognition, labyrinthe de Morris, mémoire, protéomique, latéralisation, stress.

TABLE DES MATIÈRES

I THÈSE	1
1 INTRODUCTION	2
1.1 Le sommeil	2
1.2 La fonction cognitive	4
1.3 L'objectif de cette thèse	5
1.4 Plan de thèse	6
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRAUX	8
2.1 Animaux et bien-être animal	8
2.1.1 Principe	8
2.1.2 Matériel et méthode	8
2.2 Opération d'implantation des électrodes	9
2.2.1 Principe	9
2.2.2 Méthode	9
2.3 Labyrinthe de Morris	11
2.3.1 Principe	11
2.3.2 Matériel et méthode	13
2.4 Polysomnographie	16
2.4.1 Le sommeil du rat	16
2.4.2 Matériel et méthode	18
2.5 Privation de sommeil	19
2.5.1 Principe	19
2.5.2 Méthode	21
2.6 Euthanasie et extraction d'organes	21
2.6.1 Matériel et méthode	21
2.7 Protéomique	22
2.7.1 Extraction, lavage et dosage des protéines	23
2.7.2 Marquage des protéines aux CyDyes	24
2.7.3 Première dimension : focalisation iso-électrique	26
2.7.4 Seconde dimension : SDS-PAGE	27
2.7.5 Coloration des gels SDS-PAGE au Ruthénium II tris	28
2.7.6 Acquisition de l'image du gel et analyse	30
2.7.7 Extraction et digestion des protéines	31
2.7.8 Identification des protéines par spectrométrie de masse	33
2.7.9 Western blotting	34
3 PROTÉOMIQUE DE L'HIPPOCAMPE DE RAT	36
3.1 Introduction	36
3.1.1 La dominance cérébrale chez le rat	36
3.2 Première hypothèse	39
3.3 Développement de l'hippocampe de rat	39

3.4	Seconde hypothèse	40
3.5	Matériel et méthode	40
3.6	Résultats	41
3.7	Conclusion	48
4	MESURE DE L'ACTIVITÉ GLOBALE D'UN RAT	50
4.1	Introduction	50
4.2	Hypothèse de travail	51
4.3	Matériel et méthodes	52
4.3.1	Expérience 1 : sensibilité et reproductibilité	55
4.3.2	Expérience 2 : stabilité dans le temps	55
4.3.3	Expérience 3 : sensibilité et comparaison avec d'autres systèmes	55
4.3.4	Expérience 4 : sensibilité avec animaux	56
4.3.5	Expérience 5 : animaux en rythme circadien et stabilité dans le temps	56
4.3.6	Expérience 6 : animaux en cycle continu	57
4.4	Résultats	57
4.4.1	Expérience 1 : sensibilité et reproductibilité	57
4.4.2	Expérience 2 : stabilité dans le temps	57
4.4.3	Expérience 3 : sensibilité et comparaison avec d'autres systèmes	58
4.4.4	Expérience 4 : sensibilité avec animaux	59
4.4.5	Expérience 5 : animaux en rythme circadien et stabilité dans le temps	60
4.4.6	Expérience 6 : animaux en cycle continu	61
4.5	Discussion	61
4.6	Article	64
5	PROTÉOME SUITE À PRIVATION DE SOMMEIL	65
5.1	Introduction	65
5.2	Hypothèse de travail	66
5.3	Matériel et Méthode	66
5.4	Résultats	67
5.4.1	Privation de sommeil	67
5.4.2	Indices de stress	68
5.4.3	Profils hippocampes	68
5.4.4	Profils glandes surrénales	69
5.4.5	Western blots	71
5.5	Discussion	71
5.5.1	Identification de protéines dans l'hippocampe de rats privés de sommeil	73
5.5.2	Identification de protéines dans l'hippocampe de rats non privés de sommeil	76
5.5.3	Privation de sommeil et l'effet confondant du stress	77

5.5.4	Identification de protéines de glandes surrénales chez les rats non privés de sommeil	77
5.5.5	Identification de protéines de glandes surrénales chez les rats privés de sommeil	78
5.6	Conclusions	79
5.7	Article	80
6	PROTÉOME SUITE À APPRENTISSAGE	83
6.1	Introduction	83
6.2	Hypothèse de travail	84
6.3	Matériel et méthode spécifique	84
6.4	Résultats	85
6.4.1	Labyrinthe de Morris	85
6.4.2	Privation de sommeil	89
6.4.3	Indices de stress	89
6.4.4	Etude comparative du profil protéomique des hippocampes par 2D-DIGE et identification des protéines	90
6.5	Discussion	93
6.5.1	Activation douce avec et privation de sommeil	93
6.5.2	Labyrinthe de Morris	96
6.5.3	Protéomique	99
6.6	Conclusions et perspectives	103
II APPENDICES		105
A	PUBLICATIONS	106
A.1	Première publication	106
A.2	Seconde publication	117
B	THÈSES SUPERVISÉES	130
B.1	Télémetrie de signaux physiologiques relatifs au sommeil du rat	130
B.2	Télémetrie de signaux physiologiques relatifs au sommeil du rat / 2	131
B.3	Informatisation de la gestion du fonctionnement d'un laboratoire de recherche	131
C	LOGICIELS DÉVELOPPÉS	133
C.1	Gemvid	133
C.2	Marquage du comportement d'activité	133
C.3	Ethovision Missing Samples (EMS)	134
C.4	Ethovision Paste Track (EPT)	134
C.5	IPGPhor 2 Reader	135
C.6	Pick List Editor	136
C.7	JRasterCreator	136
BIBLIOGRAPHIE		139

ACRONYMES

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANOVA	Analysis Of Variance
ARN	Acide Ribonucléique
BVA	Biological Variation Analysis
DIA	Difference In-gel Analysis
EEG	Electronencéphalogramme
EMG	Electromyogramme
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
L-LTP	Late Long Term Potentiation
MWM	Morris Water Maze
MS	Mass Spectrometry
NREM	Non-REM
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PS	Paradoxical Sleep
PSW	Paradoxical Sleep Window
RE	Reticulum Endoplasmique
REM	Rapid Eye Movement
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

La signification des acronymes des protéines étudiées sont insérées dans le text, aux endroits *ad hoc*.

Première partie

THÈSE

INTRODUCTION

1.1 LE SOMMEIL

Le simple fait que, chaque jour, nous passons approximativement 8 heures à dormir suggère que le sommeil doit avoir une fonction physiologique importante. De manière similaire à l'être humain, tous les animaux montrent des cycles de repos et d'éveil comportemental de différentes durées. Ces phases de repos montrent bien souvent des conditions semblables à notre sommeil [171]. Chez l'humain et les vertébrés en général, le sommeil est défini de manière générale comme un état périodique de quiescence dans lequel le traitement de l'information sensorielle est minimal et aucune interaction avec les congénères ou l'environnement n'existe [19]. Ainsi défini pour des animaux possédant des structures cérébrales complexes, le sommeil est généralement considéré comme étant principalement requis pour le fonctionnement cérébral normal. Cette idée est supportée par les effets de la privation de sommeil : la perte de sommeil, même d'une partie de sommeil seulement, mène à des changements très nets dans l'activité électrophysiologique du cerveau [19, 53]. Parmi les principales modifications neurobiologiques constatées, les premiers symptômes de privation de sommeil concernent les fonctions de "haut niveau" du cerveau comme l'humeur, les fonctions cognitives et le contrôle moteur [101, 8]. Cependant, il ne faut pas oublier qu'à côté de ses effets sur le système nerveux, la restriction de sommeil influence également des fonctions périphériques telles que la circulation, le métabolisme ainsi que les systèmes endocriniens et immunologiques [43, 184, 70]. Compte tenu du fait que la privation de sommeil entraîne des changements complexes dans de nombreux systèmes et puisque nous ne savons pas lequel d'entre eux est plus important que les autres, la fonction exacte du sommeil est toujours le sujet d'un débat dans les sciences de la vie [67].

Les hypothèses à propos de la fonction du sommeil sont nombreuses et beaucoup d'entre elles tentent d'expliquer la fonction du sommeil comme un processus homéostatique. Certaines hypothèses se focalisent sur différents aspects de l'homéostasie du cerveau comme la restauration, la balance énergétique, la régulation de la température ou la détoxification. L'hypothèse de restauration a été développée par Benington et Heller [15] : ils suggèrent que le sommeil est un état permettant de reconstituer les stocks de glycogène dans le cerveau, ceux-ci servant alors de tampon important d'énergie supportant l'activité neuronale durant la phase d'éveil [79, 24]. Une autre hypothèse défend l'idée que le

sommeil est un état permettant la plasticité neuronale et l'organisation (ou la réorganisation) synaptique [13, 174] qui non-seulement serait nécessaire au fonctionnement ainsi qu'à la communication neuronale de base mais constituerait également un substrat pour l'apprentissage et les processus de mémoire [46, 190].

Ce qui rend la compréhension de la fonction du sommeil si difficile est notamment le fait que le sommeil n'est pas un état homogène. L'activité électrique du cerveau change durant le sommeil en suivant un motif cyclique où le sommeil lent succède au sommeil paradoxal (voir la description de ces stades à la section 2.4.1). Puisque le sommeil est composé de ces deux stades, il se peut qu'il ait plusieurs fonctions dépendantes de ses stades [14, 156, 188]. Une récente hypothèse postule, par exemple, que le sommeil lent serait un stade servant tout d'abord l'homéostasie synaptique [174, 103]. Selon cette hypothèse, une activité neuronale plus intense durant l'éveil promeut la potentialisation synaptique ainsi que l'augmentation de force, taille et nombre de synapses. Cette potentialisation synaptique induite par l'éveil réduirait les réserves d'espace et d'énergie disponibles dans le cerveau et, inversement, le sommeil servirait à ramener la force synaptique globale à un niveau plus bas. De façon importante, la réduction synaptique durant le sommeil lent diminuerait la force synaptique globale mais conserverait les différences relatives de force synaptique acquises durant l'éveil entre des populations de neurones spécifiques.

Le sommeil paradoxal, d'un autre côté, pourrait permettre la plasticité neuronale et promouvoir la force synaptique, en particulier dans les circuits neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire [190]. Un tel rôle du sommeil paradoxal est supporté par le fait qu'après l'éveil associant traitement de l'information et apprentissage, les stades successifs de sommeil paradoxal sont caractérisés par la réactivation de motifs de décharges neuronales spécifiques à cet apprentissage (tant la LTP que la L-LTP [145], voir ci-dessous) et la ré-expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique et la formation de la mémoire [77, 13].

De cette manière, les stades de sommeil lent et paradoxal pourraient, ensemble, servir à maintenir l'homéostasie synaptique globale et, en même temps, promouvoir la force synaptique relative de certains circuits qui sont utilisés activement pour la consolidation des traces de mémoire et les fonctions cognitives. Ainsi, ensemble, les deux états de sommeil pourraient augmenter l'efficacité synaptique et son rapport signal sur bruit.

Quelles que soient la ou les fonction(s) exacte(s) du sommeil, ce dernier est certainement nécessaire à un fonctionnement correct et équilibré des fonctions mentales. En effet, sans le sommeil, l'humeur, la performance motrice et la fonction cognitive sont les fonctions les plus touchées [133, 55]. Au cours de cette thèse, nous nous intéresserons

plus particulièrement aux conséquences de la privation de sommeil sur la fonction cognitive.

1.2 LA FONCTION COGNITIVE

La fonction cognitive peut être définie à deux niveaux : comportemental et cellulaire.

Au niveau comportemental, la mémoire est la combinaison de trois stades : la réception et le traitement d'une information perçue, la création d'un enregistrement permanent de cette information encodée et la récupération, le rappel de cette information encodée.

De manière temporelle, la mémoire peut être séparée en mémoire à court terme (ou mémoire de travail) et mémoire à long terme. Généralement, la mémoire à court terme retient de petites quantités d'informations pendant de courtes durées (quelques secondes) [98]. Cette mémoire à court terme ne crée pas de changements neuronaux pour un éventuel rappel ultérieur. D'une manière ou d'une autre, cette information est transférée dans la mémoire à long terme par un mécanisme de consolidation dont les mécanismes commencent à être connus (voir ci-dessous). Dans ces mécanismes, l'hippocampe ainsi que la zone para-hippocampique jouent un rôle important [56].

Il existe différents types de mémoire à long terme. On distingue ainsi de manière générale, chez l'humain, une mémoire déclarative d'une mémoire implicite en se basant sur la nécessité d'un rappel conscient explicite ou non [189]. Dans la mémoire déclarative, on distingue aussi une mémoire épisodique d'une mémoire sémantique sur base du contexte spatio-temporel ou non dans lequel cette mémoire est créée ou rappelée [175]. La mémoire implicite pouvant être divisée en connaissances procédurale, conditionnement, mémoire non associative et *priming* (figure 1).

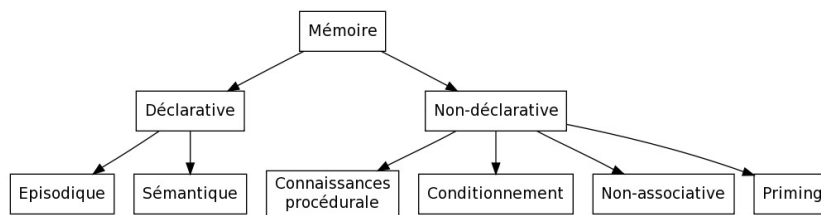


FIG. 1: Classification des types de mémoire (selon [189])

Au niveau cellulaire, la potentialisation à long terme (LTP : *long-term potentiation*) fournit un modèle attrayant pour la mémoire à long terme [56]. La LTP est l'augmentation continue de la force synaptique suite à une stimulation à haute fréquence d'une synapse chimique. Son association avec le processus de mémoire comportementale fait suite aux effets de sa manipulation (blocage, manipulation génétique de ses composants) sur la mémoire. Son inverse, la dépression à long terme

(LTD : *long-term depression*) est généralement associée au comportement de mémoire.

D'autre part, l'induction de la mémoire à long terme (sa "consolidation") à partir de la mémoire à court terme est caractérisée par une dépendance à une phase de synthèse d'ARNs et de protéines limitée dans le temps [48]. Ainsi, les facteurs de transcription suivants jouent un rôle important dans la plasticité synaptique et la formation de la mémoire : le *cAMP response element binding protein* (CREB), le *CCAAT enhancer binding protein* (C/EBP), l'*activating protein 1* (AP-1), l'*early growth response factor* (Egr) et le *Rel/nuclear factor κ B* (Rel/NF κ B) (pour une revue, voir [3]). Les fonctions de ces différents facteurs suggèrent qu'après apprentissage, l'information est "transformée" en mémoire à long terme par induction d'états cellulaires différents. Ces changements sont accompagnés de modifications de la chromatine et de l'ADN au niveau des gènes connus pour être impliqués de manière critique dans la mémoire à long terme.

Un dernier élément moléculaire prend également son importance dans le contexte de cette thèse : les cellules de lieu (*place cells*). Mises en évidence par O'Keefe et Dostrovsky [121], ces cellules sont des neurones hippocampiques (neurones pyramidaux de CA1 et CA3) montrant un taux d'activité plus élevé lorsque l'animal se trouve dans un endroit particuliers de l'environnement et un taux d'activité réduit dans d'autres endroits. O'Keefe et Nadel ont alors émis l'hypothèse que le rat est capable de former des cartes cognitives de son environnement dans son hippocampe. Ces cartes cognitives permettent la représentation de lieux tant en terme de distances que de directions entre les objets de l'environnement. Ces cartes permettent ainsi à l'animal d'agir à distance, de naviguer vers un endroit, même si ce dernier n'est pas dans le champ de perception immédiat.

1.3 L'OBJECTIF DE CETTE THÈSE

Le labyrinthe de Morris (voir section 2.3) est un test des capacités d'apprentissage spatial chez les rongeurs permettant de visualiser cette augmentation d'activité en fonction des endroits visités par le rat [26]. Dans le milieu des années 1990, Smith et son équipe ont démontré, par l'utilisation du labyrinthe de Morris et de la privation de sommeil paradoxal chez le rat, l'existence de "fenêtres de sommeil paradoxal" (PSW, *Paradoxical Sleep Window*) [159, 161, 160, 162]. Ces fenêtres sont définies comme un temps après acquisition d'un tâche, temps au cours duquel le sommeil paradoxal augmente par rapport aux niveaux normaux de ce stade. Bien que le temps d'apparition de ces fenêtres après apprentissage dépende de nombreux facteurs (organisme, souche, type de tâche et nombre de répétitions), elles ont également en commun le fait que la suppression du sommeil lors de

leur déroulement supprime également le processus de consolidation de la mémoire en cours [160]. Plus spécifiquement, lorsque Smith prive des rats Sprague-Dawley de sommeil paradoxal durant les 4 heures suivant 12 tests d'apprentissage du labyrinthe de Morris, les rats montrent des performances significativement inférieures à ceux dont le sommeil n'a pas été perturbé (figure 2) [162].

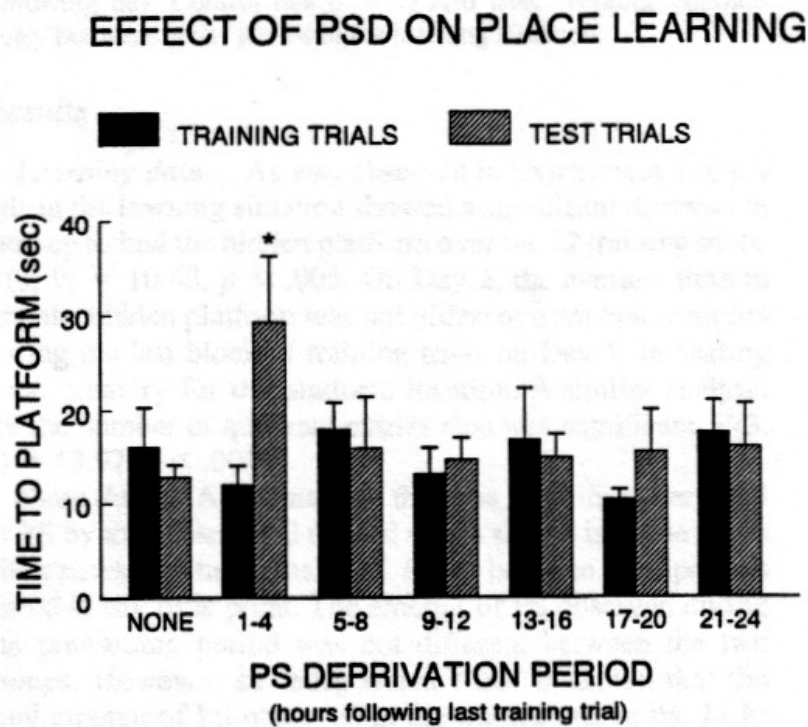


FIG. 2: Moyenne du temps mis à trouver la plate-forme cachée du labyrinthe de Morris pour les 4 derniers tests d'apprentissage (barres pleines) et pour les 4 derniers tests de rétention, le lendemain (barres à rayures) [162]. Seuls les rats privés de sommeil paradoxal durant les 4 premières heures après apprentissage (groupe "1-4") ont de moins bonnes performances de re-test.

L'objectif de cette thèse est de poursuivre les études de Smith au niveau moléculaire et d'étudier les changements de niveaux d'expression des protéines hippocampiques de rats ayant appris la tâche du labyrinthe de Morris. Pour ce faire, une série de mises au point sont nécessaires : expression de base, quantification de l'activité globale, différence d'expression suite à la privation de sommeil, ...

1.4 PLAN DE THÈSE

Dans ce paragraphe, je vais introduire brièvement le contenu et la logique de chaque chapitre de cette thèse. Dans le **chapitre 2**, le matériel et les méthodes génériques employées au cours de cette thèse seront présentés, précédés d'une courte description de leur raison d'être. Au **chapitre 3**, une étude protéomique de l'hippocampe de rat en l'absence

d'apprentissage spatial spécifique est présentée. La première question est ici de savoir s'il existe une différence quantitative d'abondance protéique entre les hippocampes gauche et droit chez le rat, celui-ci étant vierge de tout apprentissage spécifique. Une seconde question à laquelle nous répondons concerne les différences d'abondance relative de protéines hippocampiques entre rats nouveaux-nés et adultes. En passant du côté comportemental, le **chapitre 4** s'attache à la description, l'implémentation ainsi qu'à la validation d'une nouvelle technique de quantification de l'activité globale d'un rat. En se basant sur les précédents chapitres, le **chapitre 5** rapporte et discute les différences au niveau des protéines l'hippocampe et des glandes surrénales de rat suite à une privation de sommeil de courte durée. Cette étude permet finalement d'introduire le **chapitre 6** où est présentée une étude de l'effet d'un apprentissage d'une tâche spatiale en début de période d'activité diurne sur le protéome d'hippocampe de rat.

MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRAUX

2.1 ANIMAUX ET BIEN-ÊTRE ANIMAL

2.1.1 Principe

Toutes les expériences ont été réalisées après approbation du protocole expérimental par le Comité d'Éthique Animale de l'Université de Liège (dossier numéro 214 du 24 mai 2003, avec modifications mineures approuvées le 18 mai 2005).

Toutes les procédures évoquées ci-dessous ont fait l'objet de mises au point dans notre laboratoire. Les protocoles présentés ici sont les protocoles définitifs.

2.1.2 Matériel et méthode

Nous utilisons des rats Sprague-Dawley mâles issus de l'élevage du C.H.U. de Liège. Ces rats sont soit âgés de 2-3 mois à leur arrivée dans l'animalerie du Centre de Recherches du Cyclotron (poids moyen de 170-220g), soit âgés de 6 mois (poids moyen de 500g).

Dès leur arrivée, les rats sont placés dans un environnement dont les paramètres physiques sont contrôlés. Le tableau 1 résume les valeurs recommandées pour chacun de ces paramètres. Toute variation observée de température, d'éclairement ou de renouvellement d'air (par rapport aux conditions standard) est corrigée le plus rapidement possible. Des variations des autres paramètres ne peuvent être corrigées.

Paramètre	Recommandation [71, 120, 181]
Température	20-25°C
Humidité relative	30-70%
Renouvellement de l'air	10-15 fois par heure
Eclairement	< 300lux
Bruit environnant	< 83dB
Cycle de lumière	12 :12h L :D1

TAB. 1: Paramètres physiques recommandés de l'environnement

À leur arrivée dans l'animalerie du Cyclotron, les rats sont hébergés par groupes de 5 par cage [127], de manière à favoriser les interactions sociales et l'établissement d'une hiérarchie naturelle [182, 181]. Après quelques jours, ils sont regroupés par 2 (ou maximum 3) par cage afin de ne pas désavantager les rats dominés dans leur accès à la

nourriture et à l'eau et pour les habituer progressivement à vivre seuls). Deux jours avant une éventuelle opération chirurgicale (voir ci-dessous), les rats sont hébergés seuls dans une cage plus petite (cages type III personnalisées Ehret).

Chaque rat est manipulé pendant au moins 10 minutes, chaque jour, au début de sa période inactive (8h00). La manipulation consiste principalement à prendre le rat par la queue, à le placer dans les bras de l'expérimentateur qui va l'opérer et à le laisser se déplacer librement dans ce nouvel "environnement". Toute information utile à propos des aspects physiques et comportementaux du rat est notée à ce moment.

Tous les deux jours (mais également s'il n'y a plus rien dans la cage avant ce terme), l'opérateur donne une poignée de nourriture (A04 pellets de SAFE ou "Rat and mouse standard diet" de Beekay Universal). Celle-ci est donc généralement disponible *ad libitum* mais est également fournie de manière contrôlée [71]. La litière est changée tous les trois jours. Après cela, les rats se retrouvent dans une cage propre, avec une litière propre, approximativement 1 mètre de tissu en papier (pour jouer et construire un nid [181]), un peu de nourriture (pour exprimer le comportement naturel de grattage) et une poignée de l'ancienne litière (afin d'éviter un nouvel environnement trop différent, trop stressant et pour garder la structure hiérarchique, dans le cas d'un hébergement en groupe) ("enrichissement de l'environnement" [127, 123]). De l'eau est toujours disponible *ad libitum*.

Lors de chaque changement de litière, les rats sont pesés. Le poids de chaque rat est consigné et son évolution est observée. Toute augmentation ou diminution irrégulière du poids indique un problème et est résolu le plus rapidement possible.

2.2 OPÉRATION D'IMPLANTATION DES ÉLECTRODES

2.2.1 Principe

L'électroencéphalogramme est le paramètre le plus adéquat pour évaluer les stades d'éveil et de sommeil chez les animaux. Afin d'enregistrer cet électroencéphalogramme, une série d'électrodes sont fixées au crâne du rat, à la surface du cerveau ainsi que dans les muscles nuquaux.

2.2.2 Méthode

Les électrodes pour l'électroencéphalogramme (EEG) sont réalisées à partir de fil de cuivre plaqué argent et isolé de Kynar (R30-B-0100, OK Industries). Chaque morceau d'environ 2.5cm de ce fil est dénudé à ses deux extrémités et ces bouts dénudés sont étamés avec du fil à souder. Une des extrémités est soudée à la rainure d'une petite vis en acier

inoxydable. L'autre extrémité est laissée libre. L'impédance de chaque électrode est vérifiée après sa création.

Les électrodes pour l'électromyogramme (EMG) sont réalisées à partir du fil d'argent enrobé de téflon. Chaque morceau d'environ 2.5cm de ce fil est dénudé à ses deux extrémités et ces bouts dénudés sont étamés avec du fil à souder. Une des extrémités est repliée sur elle-même afin de ne pas offrir d'aspérité pouvant blesser l'animal. L'impédance de chaque électrode est vérifiée après sa création.

La tresse de connexion est réalisée dans les mêmes fils de cuivre plaqués à l'argent et isolés de Kynar que les électrodes d'EEG, dénudés aux deux extrémités. Les fils, d'une longueur d'environ 20cm, sont placés dans une gaine plastique. Chacune des extrémités est soudée à un connecteur mâle. La zone non gainée est enchâssée dans du ciment dentaire. L'impédance de chaque fils est vérifiée après la création de la tresse.

Les solutions d'anesthésie et de réveil sont préparées à l'avance par le pharmacien du Centre de Recherches du Cyclotron :

- la solution d'anesthésie est composée de : Domitor 1mg.ml^{-1} (Novartis), Ketalar 50mg.ml^{-1} (Bedford Laboratories)
- la solution de réveil est composée de : 0.3ml Antisedan (Novartis), 1ml Temgesic (Schering-Plough) et 1.2ml NaCl 0.9%

Avant opération, le rat est pesé. Le volume adéquat de solution d'anesthésique est injecté dans une patte arrière, en intra-musculaire. Le crâne du rat est rasé et le rat est placé de manière adéquate dans un cadre stéréotaxique avec une couverture chauffante. Durant toute la durée de l'opération, les tissus sont régulièrement humidifiés avec une solution physiologique.

Avec une lame de rasoir, on effectue une incision sagittale antéro-postérieure, à partir du point entre les yeux du rat et jusqu'au début de sa nuque. La peau ainsi coupée est maintenue sur le côté avec des clamps de type bulldog (FST 18374-43), le crâne est lavé avec de l'eau oxygénée diluée et le champ opératoire est délimité par cautérisation avec un fer à souder sur son pourtour. A l'aide d'une micro-foreuse (Proxxon FBS 240IE) et de fraise d'un diamètre de 1.4mm, des trous sont creusés dans l'os du crâne à l'emplacement des électrodes (table 2 et figure 3). Avec une pince à bouts fins, on déchire délicatement la dure-mère. Le filetage des électrodes est alors inséré dans les trous ainsi créés, leur extrémité étant en contact avec la pie-mère.

Une fine couche d'un premier ciment dentaire (C&B SuperBond) est appliquée. Juste sous la peau, deux sillons sont créés à partir de l'arrière de l'ouverture en direction de la nuque et de chaque patte antérieure et une électrode EMG y est glissée. Toutes les électrodes sont soudées à un connecteur électronique femelle. Le second ciment dentaire (Heraeus-Kulzer Paladur) est alors appliqué de manière à recouvrir toutes les électrodes et tous les connecteurs. La peau est alors rabattue sur le sommet du crâne et suturée de manière à fermer

Électrodes	Emplacement
Antérieures	1mm en avant de Bregma et à 2mm de la ligne sagittale
Postérieures	2mm en avant de Lambda et à 3mm de la ligne sagittale
Terre	5mm en avant de Bregma ou 3mm en arrière de Lambda, latéralement

TAB. 2: Emplacement des électrodes

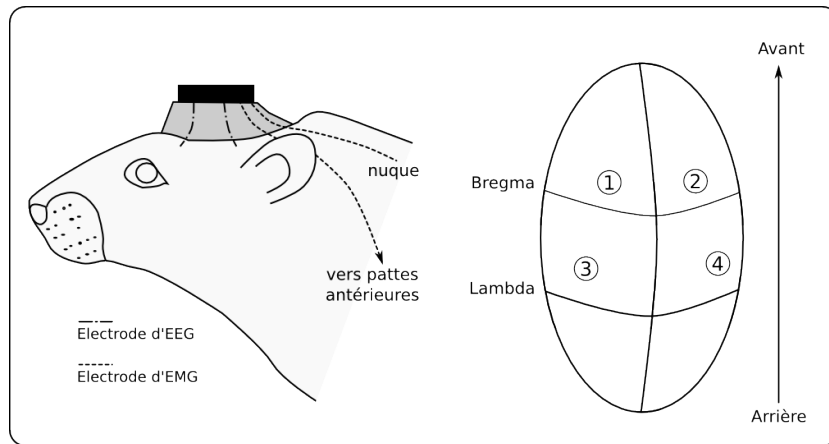


FIG. 3: Schéma d'emplacement des électrodes sur le crâne d'un rat. A droite, vue sagittale de la tête d'un rat avec le plug et électrodes d'EEG et d'EMG. A gauche, schéma de dessus de l'implantation des électrodes d'EEG sur l'os crânien du rat.

complètement l'ouverture. De l'iso-bétadine est étendue sur la peau autour de l'ouverture. Le rat est finalement sorti du cadre stéréotaxique, un volume adéquat de solution de réveil est injecté et le rat est laissé quelques heures sous une lampe chauffante.

2.3 LABYRINTHE DE MORRIS

2.3.1 Principe

Durant les 20 dernières années, le labyrinthe de Morris (Morris water maze, MWM) est devenu un test standard et un des modèles comportementaux les plus populaires pour l'étude des bases neurobiologiques de l'apprentissage et de la mémoire spatiale. Il a été développé pour tester les capacités d'apprentissage spatial allocentriques chez les rongeurs. Ce labyrinthe est basé sur l'hypothèse que les animaux ont développé, durant l'évolution, une stratégie optimale pour l'exploration de leur environnement et vont tenter de s'échapper d'un environnement hostile grâce à un minimum d'efforts (en parcourant la distance la plus petite possible) [45]. C'est une tâche très efficace, nommée d'après son inventeur, Richard G. M. Morris [116].

Dans la forme la plus courante de cette tâche, le rat tente d'avoir pied dans une piscine circulaire remplie d'eau en utilisant des indices afin de localiser une plate-forme.

- Si la plate-forme est visible ou possède une "balise" (beacon : bloc de bois, indice proximal, par exemple), le rat apprend à nager directement vers cet indice visible (cas du "Cue group" de l'expérience de Morris [116]).
- Lorsque la plate-forme, submergée, est invisible, le rat se base sur d'autres repères (indices distaux) pour localiser la plate-forme (cas du "Place group" de l'expérience de Morris [116]). Ces indices visuels sont disposés sur les parois entourant la piscine. La plate-forme est cachée 2-3cm sous la surface de l'eau. L'eau peut être teintée avec de la peinture non toxique ou de la poudre de lait pour améliorer les performances de suivi automatique de la trajectoire du rat [25, 151, 30]. Nous nous focaliserons sur les expériences à plate-forme cachée dans la suite.

La théorie moderne de l'apprentissage associatif est basée sur l'hypothèse que les indices distaux sont combinés pour composer ces fortes associations. En règle générale, les rats sont capables de trouver la plate-forme avec seulement deux repères [30] mais ont des difficultés à la trouver lorsqu'un seul indice est disponible.

Deux grands groupes de protocoles existent, tous deux employés en routine [38] :

1. Un premier protocole utilise plusieurs tests (multiple trial ou multitrial) où la plate-forme reste à la même position dans la piscine, tous les jours. Ce test s'adresse à la mémoire de référence et est parfois appelé la version allocentrique du labyrinthe [10]
2. Un second protocole utilise une plate-forme qui change de place entre chaque test (one trial). Ce test implique le phénomène de *matching-to-place* et est parfois appelé version *delayed-alternation* du labyrinthe [10]

Lorsque les rats sont entraînés à atteindre la plate-forme cachée au départ de différents points sur le bord de la piscine, la performance optimale requiert la connaissance des positions relatives des repères visuels hors du labyrinthe et celle de la plate-forme, par rapport à ces repères [177]. O'Keefe a proposé que cette connaissance impliquerait une navigation basée sur des stratégies de lieu (*place strategies*) et que l'hippocampe serait nécessaire pour cette tâche [121].

En plus des composantes de mémoire, la tâche du labyrinthe de Morris permet l'identification d'autres composantes du comportement comme la motivation, la perception sensorielle, l'existence de motifs de recherche et les capacités motrices. Ces différentes composantes devraient pouvoir éclairer les modulations temporelles parfois observées dans ce processus, en regard du rythme circadien [177].

Au début de l'apprentissage, les animaux normaux tournent en rond contre les bords de la piscine (thigmotaxis) et essaient de s'accrocher aux parois ("hugging walls") [83]. Ce comportement serait une réaction de panique, diminuant par la suite, au fur et à mesure que l'animal apprend qu'une plate-forme sûre est disponible. Cependant, certaines études suggèrent aussi que ces cercles seraient également une méthode de recherche par défaut, pour passer le temps. C'est seulement par la suite que les rats passent progressivement plus de temps dans les anneaux intérieurs de la piscine, ainsi qu'une proportion de temps plus grande dans le quadrant-cible pour prendre finalement un chemin direct vers la plate-forme. Durant des séries répétées de tests d'acquisition, la thigmotaxie tombe à un niveau très bas. Les animaux ayant reçu des lésions cérébrales (notamment au prosencéphale) montrent des taux plus élevés de thigmotaxie ; c'est aussi un comportement caractéristique chez les animaux traités avec la scopolamine (dans ce cas, le déficit de performance est associé à un déficit sensori-moteur) [83].

Les procédures d'apprentissage et de re-test dans les différents laboratoires présentent une très grande hétérogénéité. Les différentes procédures d'apprentissage pourraient mettre en évidence des processus d'encodage et de consolidation différents [42] :

- les rats peuvent apprendre des tâches spatiales suite à des apprentissages en masse (massed training), c'est-à-dire effectuer un grand nombre de tests d'apprentissage avec des intervalles de temps très courts entre ceux-ci. On considère que cet entraînement implique un processus d'encodage basé sur la mémoire spatiale de travail ;
- les rats peuvent aussi apprendre des tâches spatiales suite à des apprentissages espacés (spaced training), c'est-à-dire effectuer des entraînements avec un certain nombre d'essais séparés par de longs intervalles de temps entre ceux-ci. Cette procédure pourrait impliquer un processus d'encodage aussi basé sur la mémoire spatiale de travail, accompagnés d'implication de la mémoire à long terme et de la consolidation de celle-ci.

Généralement, le comportement de l'animal dans le labyrinthe de Morris est enregistré de manière semi-automatique, à l'aide de logiciel de suivi (videotracking) [164].

2.3.2 Matériel et méthode

Une piscine circulaire de 180cm de diamètre est placée dans une pièce où des indices visuels constants (un carré rouge de 110cm de côté, un cercle bleu de 110cm de diamètre et un poster publicitaire de taille A0) sont pendus au mur. L'intensité lumineuse perçue au bord de la piscine est de 133.125 ± 24.169 lux. La veille de toute utilisation, la piscine est remplie d'eau, colorée en noir avec de la peinture et chauffée jusqu'à environ 22°C. L'eau est vidée complètement après chaque expé-

rience, la piscine est nettoyée à chaque fois. La plate-forme circulaire de 20cm de diamètre est placée à 4cm sous le niveau de l'eau, au centre d'un des quadrants (voir ci-dessous).

Deux ensembles de zones de détection sont virtuellement définis :

1. une zone extérieure (anneau circulaire de 30cm à l'intérieur du bord de la piscine), une zone intérieure ainsi qu'une zone intermédiaire (figure 4) ;
2. quatre quadrants de surface égale, identifié par les quatre points cardinaux, et la zone occupée par la plate-forme (figure 5)

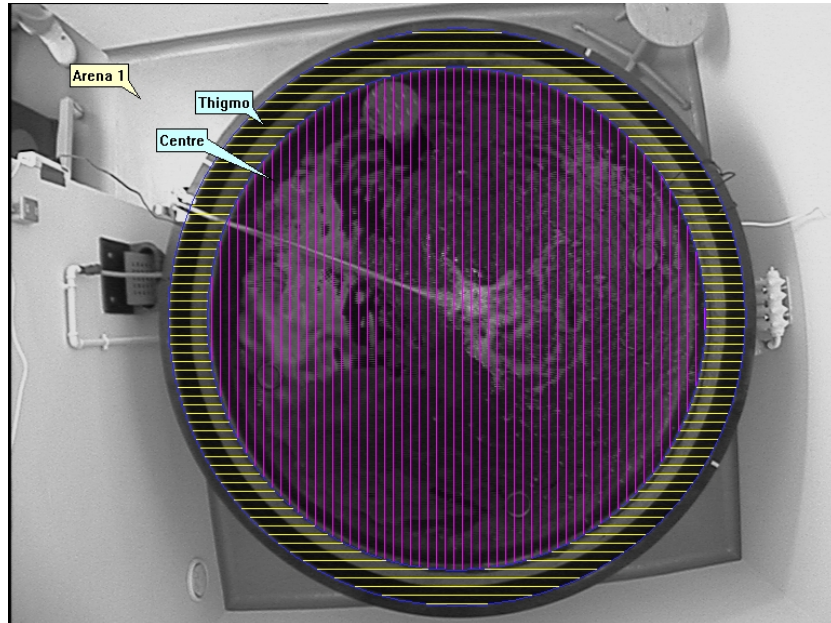


FIG. 4: Capture d'écran de la définition des zones d'acquisition en anneaux. La zone de thigmotaxie ("Thigmo") est large de 30cm.

Toujours dans le logiciel de suivi automatique du trajet des rats (Noldus Ethovision 3.1), les paramètres d'acquisition suivants ont été définis :

- durée d'enregistrement : 2 minutes par essai
- fréquence d'acquisition : 12.5 images par secondes (défini comme fréquence idéale sur notre matériel par downsampling)
- méthode de détection : niveaux de gris
- définition du seuil de bruit : aucune
- intensité de l'objet à suivre : toujours plus claire que le fond
- taille minimale de l'objet : 35 pixels (pas de taille maximale)
- filtrage de l'objet : érosion d'un pixel suivie d'une dilatation d'un pixel
- zone de recherche sur fenêtre complète (prend en compte d'éventuels parcours sous l'eau)
- paramètres de mobilité : aucun

Lors du test d'apprentissage, une nouvelle séquence de tests est définie, portant le numéro de l'animal. La température de l'eau ainsi

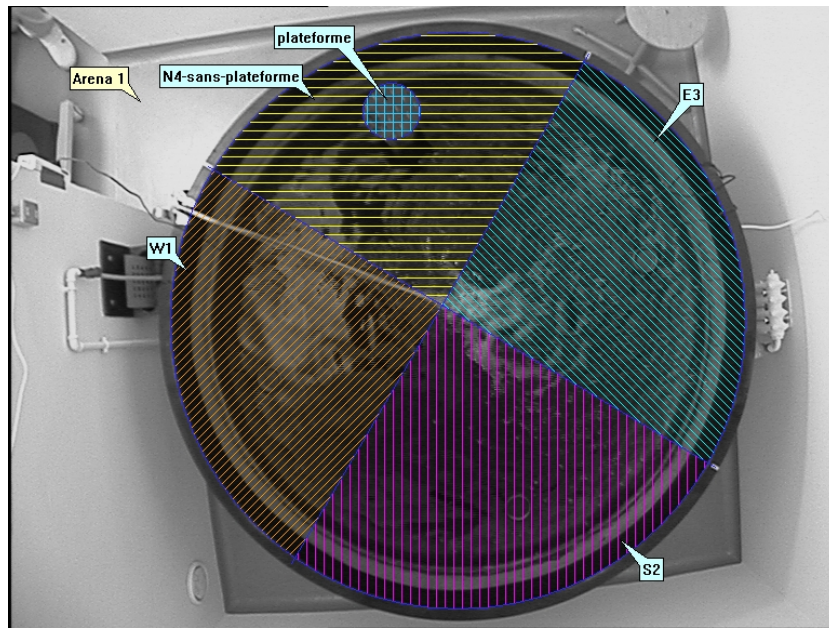


FIG. 5: Capture d'écran de la définition des zones d'acquisition en quadrants (N = nord, E = Est, S = sud, W = ouest). Les numéros correspondent aux zones définies dans le logiciel Ethovision

que la température et l'humidité relative de la pièce sont consignées. Le rat est emmené, dans sa cage, dans la pièce. L'enregistrement du parcours du rat est lancé et le rat est ensuite placé dans la piscine, face contre le bord, au milieu du quadrant de départ. Le rat est laissé dans la piscine, sans autres indices visuels que ceux fixés au murs, soit jusqu'à ce qu'il trouve la plate-forme et y reste plus de 5 secondes, soit jusqu'à ce qu'il passe plus de 120 secondes dans la piscine. Durant le test, l'expérimentateur n'est pas visible pour l'animal. Dans les deux cas, Ethovision arrête l'acquisition automatiquement. Le rat est alors placé dans une cage avec un essuie de bain épais pendant 2 minutes (sauf après les essais 4 et 8 : 5 minutes) avant de passer à l'essai suivant. Au total, le rat subit 12 essais d'apprentissage successifs.

Les quadrants de départs pour les 12 tests d'apprentissage sont, successivement : N, E, S, W, E, W, N, S, E, N, W, S (ordre pseudo-aléatoire défini par le prof. C. Smith).

Les tests de rétention sont effectués le lendemain des tests d'apprentissage, à la même heure de la journée, et en suivant la même procédure. Les quadrants de départ sont successivement : N, S, W, E.

Les paramètres suivants sont calculés automatiquement par Ethovision, pour chaque test et chacune des zones d'enregistrement pour chacun des tests : durée et distance parcourue totale ainsi que durée et distance avant entrée dans une zone. Les images des parcours sont sauvegardées avec le logiciel EPT (cfr. section C.4). Les données brutes des parcours sont également enregistrées. Afin d'avoir un contrôle de qualité, le nombre d'échantillons ratés (cfr. section C.3) est calculé avec

le logiciel EMS : un test est éliminé dès qu'Ethovision a manqué plus de 10% des échantillons.

2.4 POLYSOMNOGRAPHIE

2.4.1 *Le sommeil du rat*

Depuis que les travaux pionniers de Kleitman et ses associés, au milieu du siècle dernier [170], ont montré l'existence de changements physiologiques se reproduisant de manière périodique durant le sommeil, plusieurs espèces ont été utilisées pour étudier les cycles veille-sommeil. Ainsi, les motifs comportementaux des rats présentent des différences frappantes entre les périodes sombres et illuminées du cycle de lumière. Le rat est typiquement un animal nocturne, concentrant la plus grande partie de ses activités quotidiennes durant la période sombre de son cycle circadien. Il est dès lors principalement en train de dormir durant la phase éclairée de son cycle (durant approximativement 60-80% d'une période de 12h de lumière). Mais le rat dort également durant la période de pénombre (durant près de 20-40% d'une période de 12h d'obscurité) [4, 171, 6].

Même les rats ayant accès ad libitum à la nourriture et à l'eau tendent à boire et s'alimenter selon un cycle circadien. Le rythme quotidien d'alimentation semble être bimodal : la prise de nourriture est concentrée au début et à la fin de la période sombre (bien que cela soit assez variable d'une souche à l'autre). 85% de la prise de boisson se fait durant la période sombre [6].

Chez le rat, les rythmes circadiens sont impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire par au-moins trois voies [6] :

1. il existe des variations circadiennes dans l'acquisition et le rappel de certaines tâches ;
2. des changements de phase ou rythme circadiens peuvent perturber les processus d'apprentissage et de mémoire ;
3. les oscillateurs circadiens peuvent donner des indices temporels aux rats et agir comme des associations lieu-temps.

C'est pourquoi Antle et Mistleberger proposent de tenir compte de l'heure dans la journée comme variable indépendante, potentiellement significative [6]. En dépit de cette recommandation, pratiquement toutes les études importantes dans notre domaine ont été réalisées au début de la période de lumière, sans autre considération.

La définition du sommeil chez les vertébrés est communément basée sur des critères comportementaux et électrophysiologiques. Sur base de critères comportementaux, il est possible d'étudier les comportements semblables au sommeil chez les vertébrés "inférieurs" et chez les invertébrés. Les critères comportementaux du sommeil sont les suivants [171] :

1. un endroit spécifique de sommeil,
2. une posture typique du corps,
3. un état de quiescence physique,
4. un seuil élevé de réactivité à des stimuli extérieurs (le critère le plus important),
5. un stade rapidement réversible et
6. une capacité de régulation (i.e. un mécanisme de compensation après perte de sommeil).

L'utilisation de l'électroencéphalogramme (EEG) est devenue une méthode de choix dans l'étude du sommeil chez les mammifères "supérieurs" grâce à la corrélation importante entre les changements du profil électroencéphalographique et le comportement chez pratiquement tous les mammifères étudiés jusqu'à présent.

Bien que un certain nombre d'études détectent jusqu'à 4 ou 5 stades de sommeil chez le rat ([197, 17, 99] par exemple), on en reconnaît principalement deux types principaux : les sommeils REM (*Rapid Eye Movement*) et NREM (non-REM). L'alternance entre ces deux types suit un cycle d'environ 20 minutes chez les rats. Cependant, ce cycle ultradien est faible et très variable d'un rat à l'autre [6].

L'électroencéphalogramme durant l'éveil est désynchronisé la plupart du temps [170]. Les ondes ont généralement une fréquence de 30-40Hz et une amplitude de près de 30 μ V. De temps en temps, des ondes θ (4-8Hz) sont enregistrées mais aucune corrélation définitive n'a pu être démontrée entre ces ondes et un comportement spécifique durant l'état d'éveil. La transition de l'état d'éveil au sommeil est caractérisée par un changement vers des ondes lentes de haut voltage. Ce stade, défini comme le sommeil non-REM, est souvent utilisé chez les animaux comme synonyme de sommeil à ondes lentes (*slow wave sleep*, SWS) ou sommeil léger (*quiet sleep*) [171]. Durant le sommeil NREM, l'EEG ne contient que des ondes lentes δ (1-4Hz) et, de temps en temps des fuseaux de sommeil [17]. L'activité EMG est faible [165]. Chez les rats, des essais de subdivision du sommeil NREM en plusieurs états transitionnels ont été tentés mais ces approches sont rarement utilisées [171].

Il est maintenant bien établi que l'activité à ondes lentes δ durant le sommeil NREM peut être prise pour un indicateur de l'intensité du sommeil. Dans de nombreuses espèces, les ondes lentes montrent un maximum rapidement après le début du sommeil et, ensuite, elles déclinent progressivement au cours de celui-ci. Cependant, le sommeil NREM s'accroît avec la durée de veille préalable et il est ainsi considéré comme important pour la récupération durant le sommeil [171, 6].

De manière périodique, les ondes corticales (NREM) se transforment en un motif rapide, désynchronisé, régulier, de bas voltage qui est caractéristique du sommeil à mouvements oculaires rapides (ou *rapid*

eye movements, REM), aussi appelé sommeil paradoxal (*paradoxical sleep*, PS). Le sommeil REM est habituellement accompagné d'une atonie (inhibition active) des muscles de la nuque et anti-gravitationnels et des mouvements rapides des yeux [171, 6]. Concomitamment à ces mouvements, des tics (*jerks*) myocloniques du corps, des crispations (*twitchings*) des vibrisses, des oreilles, paupières, nez, bouche et pattes antérieures sont aussi fréquents mais pas toujours observés [170, 40]. Ils sont appelés "activités phasiques".

Au niveau électrophysiologique, on détermine le début du sommeil REM par l'apparition d'ondes corticales θ (4–8Hz) avec une amplitude d'EMG très basse [165, 27]. Durant le sommeil du rat, la durée et la fréquence d'apparition des accès de sommeil REM augmente graduellement. Pour Coenen et ses collaborateurs [40], les phases de sommeil paradoxal sont distribuées tout au long de la période éclairée, avec la plus haute densité au milieu de la première moitié et au milieu de la seconde moitié. On trouve une large gamme de durées, avec les plus longs épisodes s'étendant sur approximativement 4 minutes. La majorité des phases (approximativement 70%), cependant, sont plus courtes que 20s.

Bien que certains ont essayé de le démontrer [40, 178], il est très difficile de détecter ces phases seulement en observant l'animal. Seule l'apparition d'ondes theta dans l'EEG hippocampique de l'animal complètement immobile est un signe de sommeil paradoxal. La quantité de sommeil paradoxal est d'environ 5.4% de la durée totale de la période sombre [40].

2.4.2 Matériel et méthode

Afin d'habituer le rat au protocole, il est enregistré pendant 30 minutes suivant la procédure décrite ci-dessous, le jour précédant l'enregistrement en conditions réelles.

L'enregistrement de sommeil se fait le plus tôt possible dans la journée, soit dès l'entrée des animaux en phase claire, soit juste après l'entraînement au labyrinthe de Morris. Le rat est placé dans sa cage (sans couvercle) et raccordé à la tresse de connexion. La cage est alors placée dans une cage de Faraday et la tresse est raccordée au collecteur tournant. L'ensemble des connexions entre le collecteur tournant et la têtère sont vérifiées visuellement. Une vérification de la résistance passant dans les câbles est réalisée avec Somnologica. Finalement, l'acquisition est lancée en même temps que la visualisation et l'enregistrement vidéo ainsi que l'analyse comportementale. Une acquisition dure 4 heures. Les paramètres d'acquisition des signaux électrophysiologiques dépendent du matériel employé (voir table 3).

Chaque séance de polysomnographie est surveillée par vidéo à partir d'une pièce différente de celle où est enregistré le rat afin de ne pas

Paramètre	Scripts Matlab	BrainQuick	Somnologica
Échantillonnage EEG	200Hz	100Hz	100Hz
Filtrage EEG direct	aucun	passe-haut à 1Hz et passe-bas à 16Hz	
Échantillonnage EMG	200Hz	100Hz	200Hz
Filtrage EEG direct	Aucun	Analogique, filtrage du 50Hz	Aucun (filtre digital après acquisition : 50, 25 et 12.5Hz)
Durée des époques †	10s	16s ‡	10s

TAB. 3: Paramètres d'acquisition et d'analyse des signaux électrophysiologiques.
 † les scripts Matlab et Somnologica permettent de choisir n'importe quelle autre fenêtre de marquage ; ‡ le système BrainQuick ne permet pas de visualiser des époques plus petites que 16s

le déranger. Ces séances sont également enregistrées et disponibles pour un marquage comportemental ultérieur. Le comportement des rats enregistrés est également observé et marqué en même temps que la polysomnographie avec le logiciel d'analyse comportementale. Outre les informations comportementales en général, ces marquages permettent de palier à d'éventuelles défaillances du système polysomnographique.

Après enregistrement, les traces polysomnographiques sont analysées et le pourcentage des différents stades de veille-sommeil est calculé. Le pourcentage des différents états comportementaux est également calculé.

2.5 PRIVATION DE SOMMEIL

2.5.1 Principe

Le sommeil est régulé de manière homéostatique par rapport à un niveau de référence interne. La privation de sommeil provoque deux réponses homéostatiques [171] :

1. une pression de sommeil, qui se passe durant la période de privation et est indiquée par une augmentation dans le nombre d'essais pour entrer en sommeil (et une augmentation correspondante dans la difficulté à produire et à maintenir un éveil) et
2. un rebond de sommeil, qui se passe lorsque le sommeil est permis après la période de privation et est indiquée par une augmentation compensatoire de sommeil.

Par exemple, chez le rat, après 24h de privation, une augmentation importante et immédiate des sommeils NREM et REM se produit, alors qu'après 6h de privation, le sommeil REM n'est pas affecté et que l'on voit une petite augmentation de sommeil NREM [171].

Il y a de nombreuses techniques de privation de sommeil décrites dans la littérature. Les techniques principales sont : la méthode de la plate-forme, des plates-formes multiples [112], des disques sur l'eau [113] et la manipulation douce.

Pour la privation de sommeil paradoxal, la technique de choix reste celle de la "petite plate-forme", aussi communément appelée méthode du "pot de fleur inversé". A l'origine, le rat est placé sur une plate-forme située au milieu d'une cuve remplie d'eau, la plate-forme étant située à 1cm au-dessus de l'eau (elle est donc au sec). Le rapport entre la surface de la plate-forme et le poids du corps du rongeur est de 1 :10 (c'est-à-dire 10cm² pour 100g). Dans une telle situation, le rat n'a pas de place pour se coucher complètement mais il peut quand même entrer en sommeil lent. Cependant, dès qu'il atteint le sommeil paradoxal, l'atonie posturale qui l'accompagne fait tomber le rat dans l'eau. Habituellement, les rats vont explorer l'environnement et tomber dans la piscine rapidement après avoir été placés sur la plate-forme pour la première fois. Un expérimentateur est donc présent pendant la première heure de privation et replacera alors le rat sur la plate-forme. Les rats apprennent rapidement à rester sur celle-ci. Il a été montré que, dans des conditions comparables, la quantité de sommeil paradoxal tombe à 10% de la ligne de base au bout de quelques jours [10].

L'hyperthermie, l'hypothermie, une diminution de la consolidation de la mémoire, une augmentation de l'agressivité, la suppression de réponses immunologiques et de nombreux autres effets ont été rapportés par l'utilisation de cette technique de privation. De plus, le stress de l'isolation sociale des animaux ayant eu une expérience sociale préalable augmente les niveaux de corticostérone circulant, promeut l'immunosuppression et augmente le comportement agressif, comme observé après privation de sommeil REM. La limitation de l'espace qui réduit l'aire de déplacement augmente également les niveaux de corticostérone dans le plasma. Ces facteurs confondants peuvent interférer avec les effets réels de la privation de sommeil [112].

En utilisant des techniques de privation de sommeil, nous ne devons donc pas oublier que, en elles-mêmes ou en conséquence de la technique, les privations sont des agents de stress et influencent un certain nombre de mécanismes physiologiques comme la prise de nourriture, la thermorégulation, la fonction immune et la modulation des activités sérotoninergique, dopaminergique, cholinergique, etc. [192].

2.5.2 Méthode

La méthode de privation de sommeil employée dans ce travail est la manipulation douce. Durant toute la durée de la privation, l'animal est observé par l'opérateur. Dès que l'animal présente des signes d'endormissement (soit électrophysiologiques, soit comportementaux [40]), l'opérateur le réveille doucement par trois moyens : en dérangeant la litière se trouvant autour du rat, en touchant les vibrisses à l'aide d'un fin pinceau ou en caressant la fourrure du rat avec ce pinceau.

Le comportement des rats est également observé et marqué en même temps que la privation, tant par Gemvid, le système d'enregistrement automatisé de l'activité développé dans notre laboratoire [134] que par marquage comportemental manuel (cfr. section C.2) :

- Pour chaque rat, les niveaux de vigilance ont été déterminés avec Gemvid durant la période de lumière avant le test. Les scores inférieurs à ces niveaux obtenus en privation ont été considérés comme du repos ou du sommeil.
- Pour chaque rat, le comportement a également été manuellement marqué dès leur apparition avec un autre logiciel développé au laboratoire. Les stades suivants de vigilance ont été défini : se reposer/dormir, bouger, manger, se laver, fourrager et explorer l'environnement. Le logiciel permet la quantification du nombre et la durée des périodes de repos/sommeil ainsi que le nombre et la fréquence des réveils imposés chez les rats privés de sommeil.

Les analyses statistiques relatives à la privation de sommeil (ANOVA, tests de Tukey et Kruskal-Wallis) ont été réalisées dans Statistica 7.1 (Statsoft).

Tous les rats ont été pesés avant et après privation de sommeil.

2.6 EUTHANASIE ET EXTRACTION D'ORGANES

2.6.1 Matériel et méthode

Une trentaine de minutes avant l'euthanasie, un eccsicateur est saturé en CO₂ par ajout de carboglace. On euthanasie le rat en le plaçant dans l'eccsicateur.

Le rat est décapité à l'aide de la guillotine. La peau et les tissus au sommet de son crâne sont découpés sagittalement. Avec les pinces coupantes, les os du sommet du crâne sont délicatement enlevés et le cerveau est sorti de la boîte crânienne. Le cerveau est placé sur sa base et ses deux hippocampes sont séparés. A l'aide de deux pinces à bouts fins, le contour de chacun des hippocampes est délimité et les hippocampes sont isolés du cerveau. Les hippocampes et cerveaux complets sont placés dans des tubes Eppendorf séparés [84].

Pour les glandes surrénales, le corps du rat est placé sur le dos. La peau, les muscles et les tissus de la paroi abdominale sont découpés sagittalement, de la taille à la cavité thoracique. Tout le système digestif est écarté et les glandes surrénales, au dessus des reins, sont extraites. Les surrénales sont conservées dans des tubes Eppendorf séparés.

Pour les expériences impliquant la privation de sommeil, l'estomac est également extrait. Il est coupé selon sa petite courbure, nettoyé, attaché sur une planche d'inspection et examiné afin d'y déceler d'éventuelles ulcérations.

2.7 PROTÉOMIQUE

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines exprimées par un organisme (le "protéome"). Les informations recherchées par les analyses protéomiques comprennent les niveaux d'expression des protéines, leurs modifications post-traductionnelles, leurs localisations sub-cellulaires, les interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique. Le succès des analyses protéomiques est dû aux différentes caractéristiques de cette approche [95] :

1. Les techniques de protéomique permettent une analyse à large échelle de l'expression des protéines dans une seule expérience, aux niveaux tissulaire, cellulaire ou des organelles. De plus, ces approches permettent d'étudier des processus physiologiques ou pathologiques sans a priori.
2. La protéomique s'occupe des molécules effectrices des cellules, les protéines. Les résultats qualitatifs et quantitatifs peuvent ainsi être directement traduits en signification biologique, contrairement à des données issues de matériel génomique et transcriptionnel.
3. Les progrès réalisés dans l'identification des modifications post-traductionnelles et des interactions entre protéines donnent accès à de nouveaux niveaux de complexité, probablement plus proches des fonctions biologiques et de leur régulation.

La première étape d'une analyse protéomique est généralement un fractionnement des protéines extraites par une électrophorèse bidimensionnelle (figure 6). Depuis de nombreuses années, l'électrophorèse bidimensionnelle est la technique de choix pour l'analyse de la composition en protéines d'un type cellulaire donné et pour surveiller les changements d'activité de gènes par l'observation des milliers de protéines orchestrant les diverses fonctions cellulaires. L'analyse des différences d'expression de chacune des protéines peut alors se faire avant de passer à l'étape d'identification. Cette identification commence par une digestion enzymatique des protéines d'intérêt. Ensuite, la taille des peptides obtenus est comparée à celle de peptides théoriques répertoriés dans des bases de données. Ainsi, les protéines d'intérêt sont identifiées avec un certain pourcentage de certitude (score de Mowse).

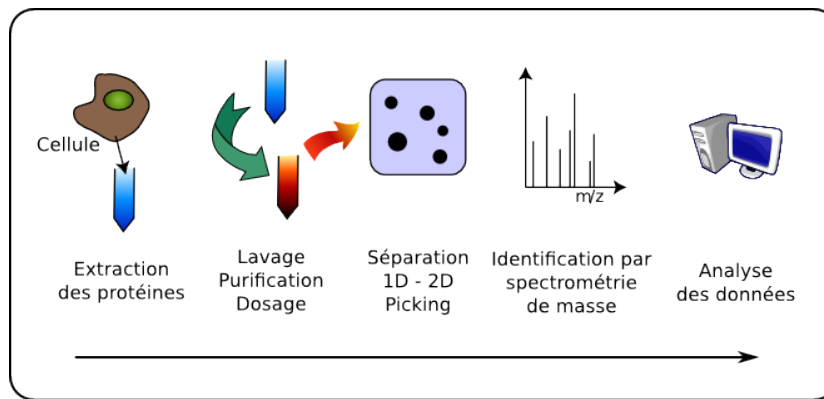


FIG. 6: Schéma des étapes d'analyse protéomique

2.7.1 Extraction, lavage et dosage des protéines

Principe

Les pièces de tissu sont d'abord mécaniquement broyées dans une solution de lyse contenant de l'urée et de la thiourée ainsi que de l'ASB-14 (amidofobétaine 14), un détergent zwitterionique augmentant la solubilisation de la plupart des protéines (cytosoliques comme membranaires) et produisant une bonne résolution d'un grand nombre de spots sur les gels 2D [28]. Les protéines sont ensuite séparées des débris insolubles par sonication [100] et centrifugation. Ces protéines solubles sont ensuite séparées de contaminants non-protéiques, sels, lipides et acides nucléiques par précipitation à l'aide d'un kit de précipitation, puis remises en solution dans la solution de lyse. Le pH de la solution est alors vérifié (il doit être à 8.5 pour permettre le couplage avec les Cy Dyes) et, finalement, la concentration des protéines est déterminée par une méthode dérivée de celle de Hartree [80] précédée d'une précipitation au déoxycholate et acide trichloroacétique [132, 41].

Méthode

Sur glace, le tissu est placé dans un volume de solution de lyse (urée 7M (ICN), thiourée 2M (GE Healthcare), Tris 30mM (pH 8.5), ASB-14 2% (Sigma), filtrée à 0.22µm (Millex GV, Millipore) 10 fois supérieur. Il est broyé dans un tube Eppendorf avec un piston en plastique. L'échantillon est ensuite soniqué 15 minutes et vortexé. Une centrifugation de 15 minutes à 8000 g permet de récupérer la partie solubilisée des protéines totales.

Le lavage de ces protéines suit les instructions du kit 2D clean-up kit de GE Healthcare. Brièvement, pour chaque volume d'échantillon, 3 volumes de précipitant (ou du TCA 20%) sont ajoutés. Le tout est vortexé 5 secondes et laissé 15 minutes sur glace. Ensuite, pour chaque volume d'échantillon, 3 volumes de co-précipitant (ou du déoxycholate 0.35%) sont ajoutés. Le tout est vortexé 3 secondes et centrifugé à 8000G,

à +4°C, pendant 10 minutes. Le surnageant est enlevé. Le culot est centrifugé à vitesse maximale pendant 1 minute et le reste de surnageant est enlevé. Trois fois le volume d'échantillon de co-précipitant est ajouté et centrifugé pendant 5 minutes à 8000G, à +4°C. 350µl d'eau milliQ sont ajoutés, ainsi que 1ml de Wash buffer et 5µl de Wash additive ; le précipité est dispersé au vortex. Les tubes sont incubés à -20°C pendant au-moins 30 minutes (toutes les 10 minutes, chaque tube est vortexé 20 à 30 secondes). Les tubes sont centrifugés à 8000G, pendant 10 minutes, à température ambiante, le surnageant est enlevé et le culot laissé à sécher pendant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans 100µl de solution de lyse, vortexé 30 secondes et incubé à température ambiante le temps nécessaire pour le dissoudre complètement. Finalement, le tout est centrifugé pendant 10 minutes à 8000G (à température ambiante).

Le pH de la solution de protéines est vérifié et éventuellement corrigé pour atteindre une valeur de 8.5.

La détermination de la concentration des protéines suit les instructions du kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad). Brièvement, une courbe étalon de BSA est préparée (concentrations de 0.1 à 3mg.ml⁻¹). Une solution A' est également préparée : elle contient 20µl de réactif DC S pour chaque ml de réactif DC A. Des duplicats ou triplicats de dilutions 5x des échantillons sont également préparés. Pour chacun des échantillons et chaque point de la courbe étalon), 25µl de volume final sont ainsi préparés. A chacun de ces tubes, 125 µl de réactif RCI sont ajoutés, vortexés et incubés à température ambiante pour 1 minute. Ensuite, 125 µl de réactif RCII sont ajoutés à chacun des tubes, vortexés et centrifugés à 15000g pendant 5 minutes. Le surnageant est alors enlevé. 127 µl de réactif A' sont ajoutés à chaque tube, vortexés, incubés à température ambiante pour 5 minutes et finalement vortexés. 1 ml de réactif DC B est ajouté à chaque tube, vortexé et incubé à température ambiante pour 15 minutes. Un aliquot de 300µl de chacun des tube est placé dans un puits d'une plaque 96 puits. L'absorbance est lue à 650nm (Elix LX-6610). Les calculs de concentrations en fonction de la dilution sont réalisés avec le logiciel Prism (Graphpad).

2.7.2 Marquage des protéines aux CyDyes

Principe

La détection en fluorescence des protéines dans un gel d'électrophorèse est une technique qui a été développée récemment [128, 129]. Cette technique vise à allier une sensibilité proche de celle d'une coloration à l'argent et une linéarité meilleure que celle des colorations organiques comme le Bleu de Coomassie.

Les Cydyes (Cy2, Cy3 et Cy5, figure 7) sont des marqueurs fluorescents de poids moléculaire et de charge similaires. En outre, leur charge correspond à la charge des résidus lysine modifiés lors de la

liaison avec la protéine. Chacune des Cydyes a un spectre d'excitation et d'émission différents, permettant leur résolution spectrale simultanée dans un même gel. Le marquage des protéines est minimal (figure 8) : une lysine marquée par protéine et seulement de 1 à 2% des protéines totales marquées. Le protocole est réalisé de manière à ce que le rapport protéine :colorant soit de 25µg :200pmol.

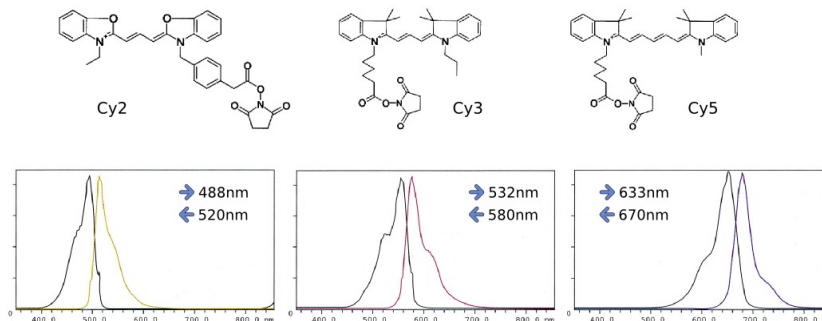


FIG. 7: Formule et spectres d'excitation et d'émission des différentes Cydyes

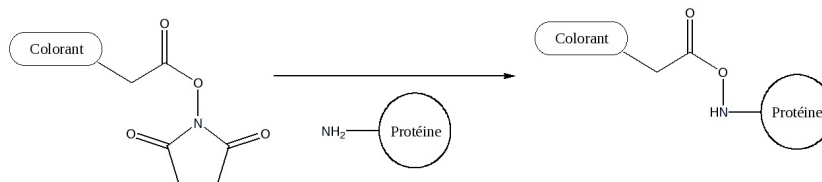


FIG. 8: Equation du marquage minimal, effectué avant électrophorèse sur les résidus lysine des protéines. La masse ajoutée aux protéines est de 464, 434 et 466Da pour respectivement Cy2, Cy3 et Cy5.

Dans une expérience standard, les échantillons des différentes conditions sont marqués alternativement de bleu et de rouge. Un échantillon regroupant toutes les conditions est marqué au Cy2 et appelé "Standard Interne". Chaque mélange comportant deux échantillons et le standard interne est séparé dans un gel 2D distinct.

Afin de vérifier le marquage, nous effectuons une électrophorèse unidimensionnelle en SDS-PAGE avec un aliquot minime des échantillons marqués qui sont ensuite rapidement visualisés avec le laser-scanner.

Matériel et méthode

Le volume de Cydyes utile est reconstitué à partir de la solution stock : 0.3µl de DMF sont ajoutés à chaque volume de 0.2µl de Cydye. A chaque volume contenant 25µg de protéines, 0.5µl de Cydye sont ainsi ajoutés. Après 30 minutes à l'obscurité (+4°C), le même volume de solution de lysine 10 mM est ajouté. Le tout est alors laissé 10 minutes à l'obscurité, à +4°C.

Le gel d'électrophorèse unidimensionnelle en SDS-PAGE contient deux zones, l'une au-dessus de l'autre : un gel de concentration (*stacking gel*, 4%) et un gel de séparation (*resolving gel*, 12%). Le gel de séparation

est préparé et coulé entre deux plaques de verre en premier. Il contient 4.1ml d'eau milliQ, 3.3ml d'acrylamide 30%, 2.5ml de Tris 1.5M, 100µl de SDS 10%, 100µl d'APS 10% et 7.5µl de TEMED. Après polymérisation sous isobutanol et après placement d'un peigne à dix dents (afin de créer des puits de chargement), on coule un gel de concentration au-dessus du premier. Il contient 1.5ml d'acrylamide 30%, 2.5ml de Tris 0.5M, 100µl de SDS 10%, 200µl d'APS 10% et 10µl de TEMED.

La solution à charger dans chaque puits contiendra la même quantité de protéines marquées avec un maximum de 0.1µl d'échantillon. Ce volume est amené à 10 µl avec de l'eau milliQ et on y ajoutera 10 µl de solution de chargement d'électrophorèse, le tout étant ensuite transféré dans un puit du gel.

La migration se fera à tension constante de 200V. Le gel sera ensuite scanné au scanner Typhoon 9400 selon la même procédure que pour les gels bi-dimensionnels (voir ci-dessous).

2.7.3 Première dimension : focalisation iso-électrique

Principe

Les protéines sont des chaînes d'acides aminés qui ont chacun des propriétés ioniques dépendantes de leur chaîne latérale. L'ensemble des propriétés de chacun des acides aminés contribue à la charge ionique générale de la protéine. Des protéines différentes auront donc une charge nette différente à un pH donné et un point iso-électrique correspondant au pH où cette charge nette est nulle. Cette propriété peut être utilisée pour séparer les protéines par focalisation iso-électrique.

La focalisation iso-électrique est réalisée dans une bandelette d'un gel d'acrylamide contenant un gradient de pH 4-7 immobilisé (IPG strip 4-7) et placée sous huile (notamment pour éviter la formation de cristaux d'urée et pour améliorer l'entrée des échantillons), à une température contrôlée de +20°C [73, 74].

Matériel et méthode

La quantité voulue du mélange de deux échantillon et du standard interne est déposée dans un tube eppendorf. Le même volume de tampon de réhydratation "4-7" 2x est ajoutée dans ce tube. Finalement, le volume final est ajusté à 450µl avec du tampon de réhydratation 1x (urée 7M (ICN), thiourée 2M (GE Healthcare), ASB-14 2% (Sigma), dithiothreitol 0.2%, IPG buffer 4-7 0.5% (GE Healthcare). L'ensemble des 450µl sont déposés de manière uniforme au fond de supports en céramique puis recouverts par l'IPG strip, face vers le bas et 1.5ml d'huile. Ces supports sont placés dans l'appareil de focalisation IPGphor. Le programme de migration est présenté au tableau 4.

Les paramètres électriques de la focalisation sont suivis par le programme Ettan IPGphor II Control Software. Sauvegardées, ces données

Étape	Différence de potentiel (V)	Durée (h)	Type
Réhydratation		12.0	
1	500	1.0	par seuil
2	1000	1.0	en gradient
3	8000	3.0	en gradient
4	8000	5.5	par seuil

TAB. 4: Paramètres de la focalisation isoélectrique

peuvent ensuite être lues et analysées avec le programme IPGphor 2 Reader (cfr. section C.5).

A la fin de la migration, les IPG strips peuvent être conservés à -80°C ou être directement utilisés lors de l'électrophorèse de seconde dimension.

2.7.4 Seconde dimension : SDS-PAGE

Principe

Avant la seconde dimension, les IPG strips doivent être équilibrés dans une solution contenant du SDS afin que les protéines puissent migrer efficacement dans les gels de seconde dimension. Le temps d'équilibration est volontairement limité à deux fois 15 minutes pour éviter une perte des protéines par diffusion [74]. L'ajout de dithiothreitol dans un premier temps assure la réduction des ponts disulfures éventuellement reformés et le dépliement complet des protéines. Dans une seconde étape, l'iodoacétamide alkyle les groupements -SH des protéines (empêchant ainsi la (re-)formation de ponts disulfures) et élimine l'excès de DTT, responsable de "point-streaking" dans des gels colorés à l'argent [73, 74].

La migration des protéines en seconde dimension se fait selon un protocole de SDS-PAGE traditionnel. Nous utilisons des gels de 12.5% de concentration en acrylamide.

Matériel et méthode

Les solutions pour les gels de seconde dimension sont préparées en fonction du tableau 5 et les gels polymérisés 24h à l'avance entre des sandwichs de plaques de verre placés dans le gel caster. Chaque gel est identifié par un numéro (inscrit dans la partie acide inférieure). Si le gel est destiné à être excisé plus tard, deux gommettes fluorescentes de référence de picking sont collées sur une des plaques de verre lors de la polymérisation du gel. Si les protéines dans le gel sont marquées aux Cydyes, des plaques low fluorescence sont utilisées.

Avant la seconde dimension, les IPG strips sont équilibrés en deux étapes de 15 minutes, sous agitation douce dans une solution d'équi-

Nombre de gels	3	4	5	6
Acrylamide-bis (ml)	100.0	133.4	166.8	200
Tris 1.5M (ml)	60	80	100	120
Eau (ml)	76.3	101	127.2	152.6
SDS 10%	3	4	5	6
APS 10%	1.2	1.6	2	2.4
Temed (μ l)	120	160	200	240

TAB. 5: Composition des solutions de polymérisation des gels de seconde dimension en fonction du nombre de gels à polymériser

libration (50mM Tris-HCl à pH 8.8, 6M urée (Promega), 30% glycérol (Bio-Rad) et 1.6% SDS (MP Biomedicals)). Du DTT 1% est ajouté à la première étape d'équilibration et de l'iodoacétamide 5% est ajouté à la seconde étape (ainsi qu'une pincée de colorant bleu de bromophénol).

Ensuite, les strips IPG sont trempés rapidement dans de l'eau milliQ et légèrement séché afin d'enlever les solutions superflues. Les strips IPG sont finalement trempés dans du SDS electrophoresis buffer 1x.

Chaque strip IPG est inséré entre les plaques de verre au sommet d'un gel de seconde dimension et 1.5ml de solution d'agarose 0.5% dans du SDS electrophoresis buffer 1x recouvre le tout. Les gels de seconde dimension sont placés dans la cuve de l'appareil Ettan Dalt six (GE Healthcare) remplie de SDS electrophoresis buffer 1x. Après placement du compartiment supérieur de l'Ettan Dalt six, du SDS electrophoresis buffer 2x est ajouté dans celui-ci. La cuve est branchée au générateur et un courant de 1W par gel pendant 60 minutes est appliqué (maximum 600V et 400mA) pour effectuer le transfert des protéines du strip au gel. Ensuite, la migration a lieu avec une puissance de 17W par gel (mêmes limites) à une température constante de 20°C.

2.7.5 Coloration des gels SDS-PAGE au Ruthénium II tris

Principe

Nous avons utilisé le Ruthénium II tris-bathophérantroline disulfonate (RuBPS) pour la détection fluorescente des protéines dans les gels d'électrophorèse préparatifs. Ces chélates de ruthénium fluorescents ont une sensibilité de détection des protéines de l'ordre du picogramme, la linéarité du marquage est très bonne (4 ordres de magnitude) et la détection est compatible avec la spectrométrie de masse [141]. Ces performances sont équivalentes à celles du Sypro Ruby (Molecular Probes) pour un coût nettement moins élevé [142].

La molécule de RuBPS est une sonde fluorescente qui se lie de manière non covalente à la protéine, après l'électrophorèse, avec une affinité réelle pour la protéine [76]. Plusieurs types de sondes à liaison non covalente ont été testés dans la littérature, tous avec leurs avantages

et défauts. Les chélates de ruthénium (comme le RuBPS) combinent une fixation efficace aux protéines avec une excitabilité élevée en fluorescence [142].

La révélation du marquage peut se faire avec une table à UV ou avec un scanner à fluorescence. Le Ruthénium II tris possède deux bandes d'absorption (à 276nm, étroite, et à 425-500nm, plus large mais moins intense) et renvoie une émission en fluorescence à un pic de 601nm (figure 9, B).

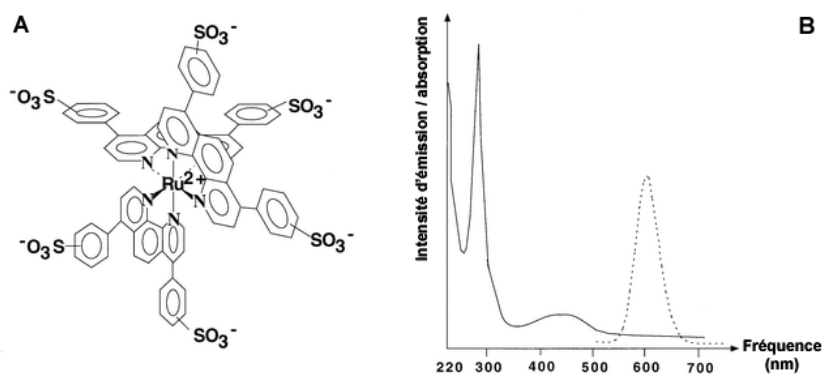


FIG. 9: Ruthénium II tris (bathophenanthroline disulfonate). A. Structure tridimensionnelle du complexe de RuBPS. B. Spectres d'absorption (trait continu) et d'émission (trait pointillé) d'une solution de 50 µM RuBPS dans l'eau (d'après [141], modifié)

La première étape de ce protocole est une fixation des protéines : pendant toute une nuit, le gel est maintenu en milieu acide, ce qui rend les protéines insolubles et les empêchent de diffuser dans le gel lors de la coloration. Cette étape permet également d'éliminer des substances qui pourraient interférer avec la coloration comme le SDS ou les ampholytes. Ensuite, nous effectuons plusieurs rinçages afin d'éliminer toute présence d'acide acétique : les acides diminuent l'intensité de fluorescence des chélates. La troisième étape est l'étape de coloration proprement dite. Pendant la quatrième étape, le gel est transféré dans l'eau. Ensuite, nous décolorons le gel ; cette étape sert à augmenter la sensibilité de la fluorescence. Finalement, nous équilibrons le gel à nouveau dans l'eau.

Méthode

Toutes les manipulations sont effectuées à température ambiante et sur agitateur ou en chambre froide (+4°C). Le volume employé pour chacune des solutions est d'au-moins 10 fois celui du gel [97] (dans notre cas : 400ml).

1. Fixation du gel dans une solution 30% norvanol, 10% acide acétique ; durée : 1 nuit
2. Rinçages du gel dans une solution 20% norvanol pendant 30 minutes ; 3 rinçages

3. Coloration du gel dans une solution 1 μ M de RuBPS (50 μ l dans 1l d'eau milliQ); durée : 6 heures
4. Équilibration du gel dans de l'eau milliQ pendant 10 minutes ; 2 équilibrations
5. Décoloration du gel dans une solution 40% norvanol, 10% acide acétique ; durée : 15 heures
6. Équilibration du gel dans de l'eau milliQ pendant 15 minutes ; 3 équilibrations

Les gels ainsi colorés sont alors scannés (voir ci-dessous). Si l'image n'est pas parfaite, on peut effectuer une étape supplémentaire d'équilibration (30 minutes dans de l'eau milliQ).

2.7.6 Acquisition de l'image du gel et analyse

Principe

L'acquisition de l'image du gel se fait par parcours de sa surface avec un laser dont la fréquence correspond à celle d'excitation du Cydye correspondant [104]. Ainsi, les protéines marquées aux Cy2, Cy3, Cy5 ou RuBPS seront respectivement excitées par des lasers émettant à 488, 532, 633 ou 276nm (figures 7, en bas et 9, B). En même temps que le laser excitateur, le gel est parcouru par une optique confocale focalisant la fluorescence émise par l'échantillon excité sur un système photomultiplicateur. Ainsi, les protéines marquées aux Cy2, Cy3, Cy5 ou RuBPS émettront avec un pic à respectivement 520, 580, 670 et 601nm. Les données d'intensité de chaque point parcouru sont ainsi collectées et digitalisées pour former une image informatique du gel.

L'analyse de l'image ainsi obtenue se fait dans un logiciel spécifique. Brièvement, les principales étapes d'analyse sont :

1. détermination d'une zone commune d'intérêt sur tous les gels composants l'analyse
2. co-détection des spots soit selon des critères automatiquement choisis, soit selon des critères imposés par l'examineur pour chaque gel ; filtrage
3. comparaisons multiples des spots détectés entre gels
4. revue visuelle des résultats des comparaisons multiples

Matériel et méthode

Les gels issus de la seconde dimension sont scannés au scanner Typhoon 9400, fonctionnant en mode fluorescence. Pour les différentes colorations ou marquages, différentes longueurs d'onde sont utilisées :

- pour le RuBPS : excitation à 532nm, lecture à 610nm avec une bande passante de 30nm ¹

¹ Ces longueurs d'onde ne coïncident pas exactement avec les longueurs d'onde théoriques d'excitation et d'émission car le matériel impose ici ses contraintes.

- pour le Cy2 : excitation à 488nm, lecture à 520nm avec une bande passante de 40nm (laser bleu à l'argon)
- pour le Cy3 : excitation à 532nm, lecture à 580nm avec une bande passante de 30nm (laser vert au Neodymium :Yttrium Aluminium Garnet)
- pour le Cy5 : excitation à 633nm, lecture à 670nm avec une bande passante de 30nm (laser rouge à l'hélium-néon)

Les images finales sont acquises à une résolution de 100µm par pixel. Le courant du PMT ² est ajusté de manière à obtenir une répartition adéquate des niveaux de gris sur toute l'image (valeur maximale d'un pixel inférieure à 100000 unités, vérification avec l'histogramme de niveaux de gris dans ImageQuant).

Les images sont stockées sur le disque dur. Afin d'éliminer les régions de gels qui pourraient perturber l'analyse (bordure de gels, mauvaise migration de protéines, ...), les images sont rognées dans ImageQuant et la région d'intérêt est enregistrée.

Les images des gels sont analysées dans le logiciel DeCyder (Amersham). Brièvement, après chargement dans la base de données, chacune des images des gels est analysée dans le module DIA (*Difference In-gel Analysis*) pour la co-détection des spots en trois couleurs, leur quantification relative par rapport au standard interne propre à chaque gel et la normalisation de ces valeurs de rapports de volume ³. Ensuite, l'ensemble des images d'une même expérience est analysée dans le module BVA (Biological Variation Analysis) : les spots délimités dans les différents standards internes sont appariés et les valeurs de volume relatives des spots de protéines marquées par les deux autres Cydyes dans les mêmes gels sont classées en fonction des comparaisons souhaitées. Les spots montrant une variation d'abondance relative statistiquement significative d'au-moins 1.2 fois (test t de Student, $p < 0.05$) sont sélectionnés pour identification par spectrométrie de masse. Tous les spots considérés par le logiciel comme significatif à un seuil de ± 1.2 sont inspectés visuellement et une "pick list" est créée.

2.7.7 Extraction et digestion des protéines

Principe

Afin d'identifier les protéines présentes dans les spots d'intérêt, ces derniers doivent être excisés d'un gel préparatif. A partir d'une liste de coordonnées des protéines d'intérêt générée par l'analyse, le robot "spot picker" détache des morceaux circulaires de gel situés à ces coordonnées. Ces morceaux de gels sont déposés sur une plaque 96 puits.

² PMT : Photo-Multiplier Tube, l'appareil électronique convertissant la lumière en courant électrique tout en amplifiant ce dernier

³ Le volume d'un spot étant le produit de sa surface délimitée sur le gel par l'intensité de ses pixels

Chacun des bouts de gel dans chacun des puits va alors subir le même traitement visant à la digestion des protéines dans un robot "*automated digester*". Ce traitement consiste d'abord en une série de lavages puis en la digestion des protéines par une sérine endopeptidase, la trypsine. La trypsine clive les protéines à l'extrémité carboxy-terminale des acides aminés lysine et arginine (sauf s'ils sont suivis d'une proline). Le pH optimal de la trypsine est aux environs de 8 et sa température optimale de fonctionnement aux environs de +30°C. Le clivage est spécifique à chacune des espèces de trypsine. La suite du traitement consiste en l'extraction des peptides hors du gel et à leur dépôt sur une plaque, enrobés d'une matrice chimique destinée à favoriser leur ionisation par la méthode MALDI.

Matériel et méthode

Une "*pick-list*" est générée à partir de la détection des spots dans les gels préparatifs et de leur comparaison avec les résultats d'abondance relative fournis par l'analyse des images des gels analytiques dans BVA. Cette liste est exportée dans le programme "*Ettan spot picker control*". Après détection des références d'excision ("*pick references*") au bord du gel, l'excision peut avoir lieu. Nous utilisons les paramètres suivants :

- volume d'éjection : 150µl
- vitesse d'éjection : 30ml.min⁻¹

Les bouts de gels excisés sont récoltés sur une plaque 96 puits insérée dans un adaptateur spécifique au robot de digestion. Cet adaptateur est ensuite placé dans le robot de digestion.

Pour la digestion des protéines d'hippocampe, les bouts de gels sont passés successivement par les étapes suivantes :

1. Trempage dans une solution de lavage 1 : NH₄HCO₃ 50mM
2. Trempage dans une solution de lavage 2 : 50% acétonitrile, 50% NH₄HCO₃ 50mM
3. Répétition des étapes 1 et 2, deux fois
4. Centrifugation des plaques et élimination manuelle des solutions éventuellement bloquées avec des bouts de gel
5. Déshydratation complète par trempage dans de l'acétonitrile 100% et élimination par assèchement à l'azote
6. Digestion par la trypsine : 30 minutes de réhydratation du gel dans une solution de trypsine bovine sequencing grade, modified (Roche) 10 ng.µl⁻¹ à +8°C suivies d'un temps de digestion de 3 heures à +30°C
7. Extraction des peptides du gel avec une solution d'acide formique 1% pendant 30 minutes à +20°C
8. Adsorption de 3µl de la solution précédente (contenant maintenant les peptides) sur la matrice d'acide alpha-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique (alpha-HCCA) déposée en couche mince (Thin

Layer, TL de la plaque MALDI jetable "MTP AnchorChip var/384 T F", Bruker Daltonics)

9. Lavage de la matrice avec 3µl de solution NH₄H₂PO₄ 10mM dans 0.1% d'acide trifluoroacétique pour enlever les sels

Pour la digestion des protéines de glande surrénale, le protocole a été décrit précédemment dans Bohler et al. [18].

Les peptides sont prêts pour une analyse en spectrométrie de masse.

2.7.8 Identification des protéines par spectrométrie de masse

Principe

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de pointe dans l'identification des protéines d'échantillons biologiques [91]. Pour leur identification, les protéines ont été préalablement clivées en peptides par une protéase dont la spécificité de coupure est connue et restreinte (par exemple, la trypsine). Les produits résultant de ce clivage peuvent alors être analysés par Peptide Mass Fingerprinting (PMF) ou soumis à une analyse des fragments d'ion par MS/MS [91].

Le PMF vise à reconnaître un ensemble très spécifique de masses moléculaires de peptides dérivés d'une protéine isolée. Le PMF est employé pour identifier la protéine analysée en comparant les masses moléculaires des peptides analysés aux valeurs théoriques calculées à partir des séquences d'acides aminés reprises dans des bases de données de séquences de protéines. Les spectres de MS sont traités et les caractéristiques les plus informatives (les pics monoisotopiques) sont extraites. Les valeurs de masse sur charge (m/z) des pics monoisotopiques et de leurs intensités sont regroupées dans une liste de pics (peak-list). Les mesures en PMF sont caractérisées par une grande résolution de masse, une large gamme de masse et la production de relativement peu de pics.

Le logiciel Mascot compare alors cette liste avec des valeurs calculées présentes dans une ou plusieurs bases de données (SwissProt, NCBI, ...) [130].

Matériel et méthode

L'identification des protéines et le Peptide Mass Fingerprinting ont été réalisés au laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Liège et au Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann au Luxembourg.

Pour les protéines d'hippocampe, l'acquisition des spectres est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse Ultraflex II MALDI (Bruker) en mode "positive reflectron", avec une calibration fine permise, la focalisation du laser Smartbeam positionnée à medium et une "fluency" du laser à 65-72% du maximum. Le retard d'extraction est de 30ns. Des

lots de 100 spectres dans la gamme de 860 à 3800Da sont acquis à une fréquence de tir du laser de 200Hz avec une évaluation automatique de l'intensité, de la résolution et de la gamme de masse. 600 spectres réussis par échantillon sont additionnés, traités et dé-isotopés en ligne avec un algorithme SNAP automatique (logiciel Flex Analysis 2.4, Bruker). Ces spectres sont alors soumis par lot (Biotools 3.0 software suite, Bruker) pour comparaison à l'aide du moteur de recherche Mascot (MatrixScience.com). Les versions 50.5 de Swiss-Prot et nr_20060605 de NCBI sont utilisées pour le rat. Une tolérance de masse de 100ppm avec calibration fine et un site de clivage manqué sont permis. L'oxydation partielle des résidus méthionine ainsi que la carbamylation complète des résidus cystéine sont pris en considération.

Pour les protéines de glande surrénale, la détermination des masses peptidiques (PMF and MS/MS) est réalisée à l'aide de l'Applied Biosystems 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). La calibration est réalisée avec le kit de calibration de masse peptidique 4700 (Applied Biosystems). Les protéines sont également identifiées par recherche dans la base de données NCBI en utilisant Mascot (MatrixScience.com). Les paramètres de recherches permettent 2 sites de clivages manqués, une tolérance de 0.5Da par fragment de MS/MS et 100pm sur la masse du précurseur. Les carbamidométhylations de la cystéine et l'oxydation de la méthionine sont permises.

Pour les deux identifications, le score de probabilité calculé par le logiciel (score de Mowse [130]) est utilisé comme critère de sélection principal pour une identification correcte. Pour des scores de Mowse légèrement au-dessus du seuil de p-value, les erreurs de mesures sont soigneusement étudiées pour détecter d'éventuels faux positifs (donnant habituellement des erreurs de mesures aléatoires alors que les identifications pertinentes donnent des erreurs de mesure constantes). Les poids moléculaires et pI expérimentaux et ceux fournis dans les bases de données sont également comparés.

2.7.9 Western blotting

Afin de confirmer la présence de certaines protéines et la différence entre les niveaux d'abondance, des Western blots 1D sont réalisés avec les mêmes échantillons de protéine que ceux employés dans l'analyse protéomique. L'alpha-SNAP et la NSF sont détectées dans les extraits protéique d'hippocampe avec des anticorps monoclonaux de souris ([ab16391](#), concentration 1µg/ml; [ab16681](#), dilution 1/2000, Abcam). La glucose-6-phosphate dehydrogenase des glandes surrénales est détectée avec un anticorps polyclonal de lapin ([ab993](#), dilution 1/1000, Abcam).

Pour les Western blots, 50µg de protéines extraites dans la solution de lyse sont combinées avec un volume égal de tampon de Laemmli et séparés par électrophorèse sur un gel de SDS-PAGE 12% surmonté d'un

gel de stacking 4% (dans un Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). Une échelle de poids moléculaire est séparée en même temps que les protéines d'intérêt (MagicMark, Invitrogen). Les protéines dans le gel sont ensuite transférées (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell) sur une membrane de PVDF de faible fluorescence de 0.2 mm d'épaisseur (Hybond-LFP, Amersham). La membrane est bloquée avec une solution de lait écrémé en poudre 3% dans une solution saline tamponnée Tween-Tris (TTBS) pendant 1h à température ambiante et incubée avec les anticorps correspondant dans du TTBS avec 3% de lait écrémé en poudre pendant une nuit à +4°C sous agitation lente. La membrane est ensuite lavée trois fois avec du TTBS (10 minutes à chaque fois), incubée soit dans une solution d'ECL Plex goat-anti-mouse IgG-Cy3 ou une solution d'anticorps secondaire goat-anti-rabbit-Cy5 (dilution 1/2500, GE Healthcare) pendant 1 heure à température ambiante et lavée de nouveau trois fois dans du TTBS (15 minutes). Les membranes sont alors lavées deux fois dans du TBS (15 minutes). Après séchage à +37°C, les membranes sont scannées à la longueur d'onde correspondante avec le Laser Scanner Typhoon 9400 (GE Healthcare). Les images des membranes sont ensuite analysées avec le logiciel ImageMaster 1D (GE Healthcare).

ETUDE PROTÉOMIQUE DE L'HIPPOCAMPE DE RAT EN L'ABSENCE D'APPRENTISSAGE SPATIAL SPÉCIFIQUE

3.1 INTRODUCTION

Avant d'entamer l'étude du protéome de l'hippocampe de rat dans certaines conditions d'apprentissage, nous nous sommes posé la question d'une éventuelle latéralisation de l'expression protéique dans l'hippocampe. En conditions normales, le rat exprime-t-il différemment (qualitativement et quantitativement) certaines protéines dans son hippocampe gauche ou droit? Lequel devrions-nous alors choisir dans les expériences subséquentes où le rat sera soumis à un apprentissage spatial ou à des privations de sommeil?

Nos résultats ne démontrant finalement aucune asymétrie d'expression protéique dans l'hippocampe, nous avons ensuite déterminé la sensibilité de notre technique protéomique, basée sur le 2D-DIGE, en comparant les hippocampes des rats nouveaux-nés et adultes.

3.1.1 *La dominance cérébrale chez le rat*

Une caractéristique typique de nombreuses espèces animales est l'existence de différences structurelles et fonctionnelles entre les hémisphères cérébraux, phénomène aussi connu sous le nom de dominance cérébrale ou latéralisation. Les oiseaux et les primates manifestent une dominance cérébrale pour divers comportements [148]. Cette dominance s'accompagne d'une asymétrie structurelle du système nerveux central. Quoique moins marquées, des asymétries comportementales ont également été rapportées chez le rat :

- Asymétries motrices
- Les rats tendent à tourner ou être en rotation spontanément en période sombre. Cette rotation tend à s'exécuter de manière préférentielle dans un sens plutôt que dans l'autre. Cette asymétrie de rotation dépendrait du système dopaminergique nigrostrié.
- Les rats peuvent utiliser des informations spatiales dans un labyrinthe pourvu qu'ils puissent utiliser l'oeil gauche (l'hémisphère droit) mais pas s'ils utilisent uniquement l'oeil droit (l'hémisphère gauche). De plus, l'utilisation de l'oeil droit est associée à des réponses pour lesquelles l'animal a considéré les conséquences des actions. Par contre, l'utilisation de l'oeil gauche est associée avec

des réponses plus immédiates, plus rapides et des comportements ayant un contenu émotionnel.

- Les rats utilisant leur hémisphère gauche adoptent une stratégie de recherche efficace et séquentielle dans le labyrinthe aux bras radiaux (*radial-arm maze*) alors que les rats utilisant leur hémisphère droit en sont incapables.
- Finalement, l'usage des vibrisses est, lui aussi, latéralisé chez le rat. Les vibrisses sont de long poils spécialisés qu'on retrouve sur la face et le nez et communément appelés poils tactiles (*tactile hairs*), poils des sinus (*sinus hairs*), moustaches (*whiskers*) ou vibrisses (*vibrissae*). Ils sont associés à des récepteurs sensoriels particulièrement adaptés à leur activité nocturne et leurs comportements (exploration, détection et reconnaissance d'objets, évaluation de distances, discrimination de textures, ...). Anatomiquement, il existe une représentation fonctionnelle somatotopique entre les vibrisses et leur représentation dans la couche 4 du cortex somatosensoriel (*barrel field*, relations mises en évidence par utilisation de colorations anatomiques simples comme Nissl ou la peroxydase) [131]. Les rats apprennent mieux un nouveau comportement de grattage avec leurs vibrisses droites que les gauches [94]. Ils apprennent aussi mieux avec l'hémisphère cérébral gauche que le droit [186]. LaMendola et Bever proposent que le système périphérie-droite-hémisphère-gauche accède à une représentation comme une carte d'un problème visio-moteur alors que le système périphérie-gauche-hémisphère-droit agit préférentiellement lors d'un apprentissage spatial [94].

Bien qu'un hémisphère puisse être dominant pour une tâche fonctionnelle particulière, les deux hémisphères contribuent le plus souvent ensemble à cette tâche [94].

Au niveau anatomique, des études ont montré des différences gauche-droite significatives pour de nombreux paramètres morphologiques de l'hippocampe. Tant Diamond [52] que Ragbetli [143] ont trouvé que l'hippocampe droit de rat mâle est plus épais que le gauche avec des différences entre hippocampes plus importantes chez les rats jeunes que les rats plus âgés. Cette différence n'existe pas chez les rats femelles (sauf à P90) [52]. Mais il n'existe pas de différences histologiques entre hippocampes gauche et droit. En effet, Niglio et ses collègues [119] ont examiné l'intensité de la coloration de Timm dans de nombreuses régions de l'hippocampe et la surface occupée par les fibres moussies par la combinaison de techniques microdensitométrique et d'analyse quantitative d'images. Ils ont montré qu'il n'y a pas de différences gauche-droite dans les densités de coloration de Timm au niveau du gyrus dentelé (*dentate gyrus*), dans la couche dendritique des champs CA1 et CA2, dans l'aire des *mossy fibers* ou dans le subiculum.

Au niveau génétique, quelques études ont montré des différences d'expression de gènes dans les hippocampes de rat. Par exemple, Mos-

kal et ses collègues ont étudié un ensemble de gènes exprimés de manière différentielle entre les hippocampes gauche et droit de rats jeunes (P6, P9 et P60) [117]. Comme le pic de prolifération des cellules granulaires dans le gyrus dentelé se produit aux alentours de P7, ils suggèrent que l'expression différentielle de ces gènes soit liée à cette phase de neuronogenèse et de différenciation neuronale car une croissance et un développement des connexions synaptiques extensives se déroulent à ce moment. Cette latéralisation de l'expression de gènes dans l'hippocampe de rat renforce l'idée qu'il existe peut-être des différences morphologiques et/ou physiologiques entre les deux hippocampes. Cette étude se situe dans la même perspective que des études réalisées chez l'humain montrant une asymétrie de transcription des gènes dans le cortex d'embryons humains. Par exemple, Sun et ses collègues ont trouvé une expression latéralisée des gènes dans les régions frontales, périsylviennes et occipitales à 12 et 14 semaines chez l'humain, une période de prolifération et migration neuronale [167].

Collectivement, ces travaux montrent l'existence d'asymétries comportementales, anatomiques et génétiques entre les hippocampes gauche et droit des rats. En revanche, il n'existe pas de données dans la littérature s'intéressant à l'expression différentielle de protéines dans l'hippocampe de rongeur. De nombreux articles ont été publiés sans mentionner de manière explicite lequel des deux hippocampes était pris en compte. Par exemple, dans l'étude de Fountoulakis sur le protéome d'hippocampe de rat Sprague-Dawley adulte (8 mois) [64], les auteurs identifient 148 protéines (dont 70% spécifiques à l'hippocampe) sans jamais spécifier quel hippocampe a été choisi ou si les deux ont été pris indifféremment. La même équipe s'est également intéressée aux protéines hypothétiques de l'hippocampe de souris mâles et semblent mélanger les deux hippocampes avant étude protéomique [2]; Pollack et ses collègues s'intéressent à la plasticité de l'hippocampe dépendante de la souche de souris [136] et semblent prendre indifféremment les hippocampes gauche ou droit [84].

Dans les récents articles de Kara McNair [110, 111], le protéome de la région CA1 d'hippocampes de rats et souris est étudié en relation avec la plasticité synaptique sans toutefois spécifier quel hippocampe a été choisi. Dans une étude sur les protéines hippocampiques impliquées dans le métabolisme énergétique et la plasticité neuronale, Ding et ses collègues ne mentionnent pas non plus s'ils se focalisent sur un hippocampe, les mélangent ou prennent indifféremment le gauche ou le droit [54].

Généralement, les études sur tranches d'hippocampes vivantes ne mentionnent pas non plus le côté d'où l'hippocampe a été prélevé (voir, par exemple [75]). Cependant, les conditions expérimentales ne sont pas appliquées à des animaux vivants mais bien directement sur la tranche, ce qui exclut d'office tout phénomène de latéralisation potentiel. C'est dans ce contexte d'une littérature peu explicite qu'il nous a paru

utile de vérifier le profil d'abondance de protéines des hippocampes gauche et droit et de les comparer avant d'aborder l'étude des effets d'une manipulation du sommeil dans une tâche d'acquisition spatiale.

3.2 PREMIÈRE HYPOTHÈSE

Si des différences fonctionnelles, morphologiques, anatomiques et même génomiques existent entre les hippocampes gauche et droit de rat adulte, il est possible qu'il existe également de telles différences au niveau de l'expression de protéines. Comme les études précédentes ne semblent pas s'être penchées sur la question, nous comparerons les hippocampes gauche et droit de rats Sprague-Dawley âgés de 3 mois et n'ayant subi aucun apprentissage particulier (ce que nous appelons rats "naïfs"). Si nous n'observons aucune différence statistiquement significative, nous pourrions utiliser indifféremment les hippocampes gauche et droit dans la suite de notre étude. Si nous observons des différences significatives, nous devons les prendre en compte dans les prochains chapitres.

3.3 DÉVELOPPEMENT DE L'HIPPOCAMPE DE RAT

Bien que la technique du 2D-DIGE soit maintenant bien validée, nous avons voulu vérifier sa sensibilité entre nos mains en effectuant une expérience de contrôle positif. Ce contrôle positif consiste en la comparaison des protéomes d'hippocampes de rats adultes (3 mois) et nouveaux nés (3 jours). Le développement du cerveau entre la naissance et l'âge adulte est tel que nous nous attendons à observer des différences d'abondance de certaines protéines entre ces deux âges, dans l'hippocampe de rat. Ces différences devraient être corrélées à celles déjà répertoriées dans la littérature.

De manière générale, l'électrophorèse 2D est une méthode rapide et fiable pour la détection de différences de niveaux d'abondance de protéines entre des états sains et malades [62]. Cependant, cette analyse peut être compliquée par des différences liées notamment à l'âge et au sexe. De telles différences ont déjà été mises en évidence dans le sérum, le foie [60], les urines et le cerveau de rats [62]. De plus, une comparaison des protéomes de cerveau à différents âges pourrait fournir d'importantes informations sur le développement et la maturation neuronale.

Chez le rat, l'équipe de Fountoulakis et Lubec a étudié à plusieurs reprises le protéome du cerveau de (très) jeunes rats. En 1999 et 2002, ils ont répertorié, en utilisant une méthode d'électrophorèse bi-dimensionnelle classique suivie de la coloration des protéines au bleu de Coomassie, les protéines de cerveaux complets d'embryons de rats (1 jour avant leur naissance) [61] et d'humains à 18 semaines [63]. Ils

ont également comparé les différences d'abondance de protéines entre les cerveaux complets de rats nouveaux nés ("pups", sans autre détail) et des rats de 8 mois [62]. Cinq protéines ont été détectées uniquement dans une condition et pas l'autre (α -fetoprotéine uniquement chez le rat nouveau né; dynamin-1, protéine de fusion vésiculaire NSF, pyruvate carboxylase, composante E1 de la 2-oxoglutarate déshydrogénase uniquement chez l'adulte). La majorité des autres protéines identifiées se retrouvent en quantité plus abondante dans une condition tout en étant présentes dans l'autre condition.

Comme on pouvait s'y attendre, l'âge est une condition physiologique qui affecte l'expression des protéines. Notre expérience comparant des hippocampes de rats de 3 mois et 3 jours devrait nous permettre de mettre ces différences en évidence.

3.4 SECONDE HYPOTHÈSE

Le développement du cerveau entre la naissance et l'âge adulte est tel que nous nous attendons à observer des différences d'abondance de certaines protéines entre ces deux âges, dans l'hippocampe de rat. Ces différences devraient être corrélées à celles déjà répertoriées dans la littérature (voir, par exemple, [62, 195]).

3.5 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Pour l'étude de la dominance latérale de l'expression de protéines dans l'hippocampe de rat adulte, nous avons extrait les hippocampes gauches et droits de 3 rats de 3 mois. Dès leur arrivée dans l'animalerie, ces animaux ont été traités de la manière décrite au chapitre 2 et ont été sacrifiés après 7 jours. Leurs hippocampes ont été prélevés et leurs protéomes ont été analysés par la technique du 2D-DIGE. Les paramètres de filtrage des images sont les suivants : protéines présentes dans au moins 6 images (sur 18 images au total), t-test ≤ 0.05 , moyenne du rapport d'abondances ≥ 2 ou ≤ -2 et volume des spots $\geq 2.10^5$ ou $\leq 10^8$.

Pour la comparaison des protéomes de rats adultes et nouveaux nés, nous avons extrait les hippocampes de 3 rats de 3 mois ainsi que les hippocampes de 3 rats de 3 jours. Dès leur arrivée dans l'animalerie, les rats de 3 mois ont été traités de manière similaire au paragraphe précédent et ont été sacrifiés après 7 jours. Les rats de 3 jours ont été directement sacrifiés. Tous les hippocampes ont été prélevés et leurs protéomes ont été analysés par la technique du 2D-DIGE. Après analyse, les spots dont les volumes varient de manière statistiquement significative entre les deux âges ont été excisés et les protéines digérées et identifiées par spectrométrie de masse. Les paramètres de filtrage des images sont les suivants : protéines présentes dans au moins 6

images (sur 18 images au total), t-test ≤ 0.05 , moyenne du rapport d'abondances ≥ 2 ou ≤ -2 et volume des spots $\geq 2 \cdot 10^5$ ou $\leq 10^8$.

3.6 RÉSULTATS

Des hippocampes de 3 rats de 3 mois ont été prélevés, leurs protéines extraites, dosées, séparées par électrophorèse 2D et analysées en 2D-DIGE. A un seuil de rapport de volumes de 2, nous n'avons pas pu observer de différence significative entre les hippocampes gauche et droit. Un exemple d'images de gels contenant des protéines d'hippocampes gauche et droit est illustré à la figure 10.

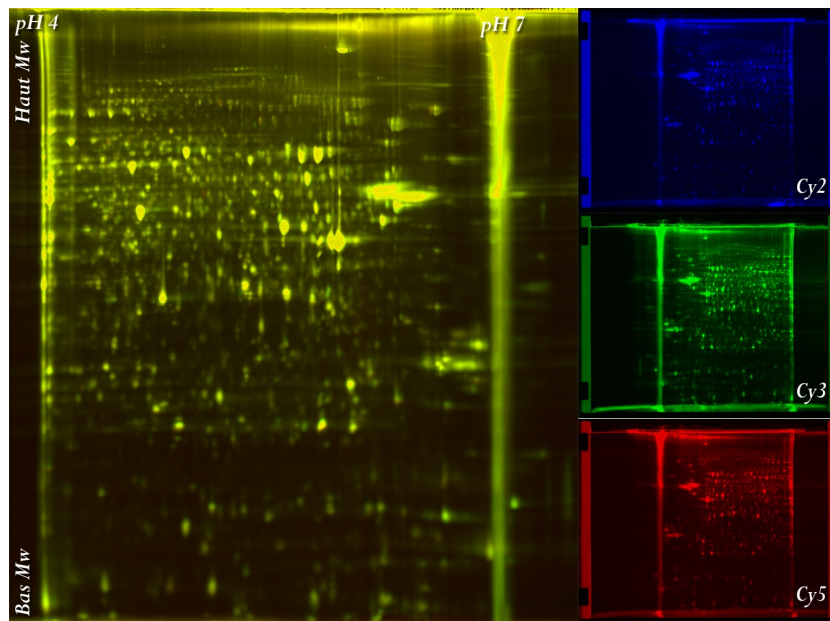


FIG. 10: Exemple de séparation de protéines issues de l'hippocampe gauche et droit. A gauche, superposition des images des protéines de l'hippocampe gauche (en vert) et de l'hippocampe droit (en rouge). A droite, succession des images des protéines du standard interne (marquées au Cy2, en bleu), de l'hippocampe gauche (marquées au Cy3, en vert) et de l'hippocampe droit (marquées au Cy5, en rouge)

Dans la seconde partie de cette expérience, des hippocampes de 3 rats de 3 mois et de 3 rats nouveaux nés ont été prélevés. Leurs protéines ont été extraites, dosées, séparées par électrophorèse 2D et analysées en 2D-DIGE. Nous avons pu observer de nombreuses différences significatives entre les hippocampes d'adultes et de nouveaux nés. Quarante-quatre protéines sont plus abondantes chez l'adulte que chez le nouveau né dont 15 ont été identifiées avec certitude (le tableau 6 reprend l'ensemble des paramètres importants pour les protéines identifiées en spectrométrie de masse). Cinquante protéines sont plus abondantes chez le nouveau né par rapport à l'adulte, dont 22 ont été identifiées avec certitude (le tableau 7 reprend l'ensemble des paramètres importants pour les protéines identifiées en spectrométrie de masse).

Un exemple d'images de gels contenant des protéines d'hippocampe d'adulte et de nouveau né est illustré à la figure 11.

Nous n'avons pas trouvé de spots de protéines dont l'abondance est statistiquement différente au seuil de 2 entre les hippocampes gauche et droit de rats adultes. Ces résultats complètent les données morphologiques [52, 143], histologiques [119] et génétiques [117] en montrant l'absence de dominance latérale pour le protéome. En l'absence de différence significative au niveau du protéome des deux hippocampes de rat, nous prendrons indifféremment l'hippocampe gauche ou le droit dans la suite des expériences (sans toutefois les regrouper dans un même échantillon).

Lors de l'analyse des images des gels comparant les hippocampes de rats adultes et nouveaux nés, nous avons trouvé 94 spots dont l'abondance varie de manière significative entre les deux conditions. L'identité des protéines correspondant à ces 94 spots d'abondances différentes a été recherchée par spectrométrie de masse. Trente et une protéines présentes dans 37 spots ont pu être identifiées avec certitude (39,4% des spots analysés).

Bien que beaucoup de protéines (26) n'aient été identifiées que dans un seul spot, plusieurs isoformes ou probables modifications post-traductionnelles ont également été détectées pour 5 protéines. Parmi les protéines plus exprimées chez le rat adulte, c'est le cas pour la GFAP (2 spots) et la Tar DNA-binding protein-43 (2 spots). Parmi les protéines plus exprimées chez le rat nouveau né, c'est le cas pour la dihydropyrimidinase-related protein 3 (3 spots), la microtubule-associated protein RP/EB (2 spots) et la transitional endoplasmic reticulum ATPase (2 spots). Ces spots contenant une même protéine sont localisés à des endroits voisins sur les gels 2D comme le montre la figure 12. Ceci laisse supposer que ces protéines ont subi des modifications post-traductionnelles affectant de manière prépondérante leur point isoélectrique. Il pourrait s'agir de phosphorylations, la modification post-traductionnelle la plus courante, qui remplace les groupements neutres hydroxyles sur les sérines, thréonines ou tyrosines par des groupements phosphates chargés négativement et dont les pKs sont proches de 1.2 et 6.5. Les protéines phosphorylées possèdent donc un point isoélectrique plus faible que celui des protéines correspondantes non-phosphorylées. Il pourrait également s'agir de glycosylations (ajout d'un groupe glycosyl aux groupes asparagine, hydroxylysine, sérine ou threonine, résultant en une glycoprotéine). D'autres modifications post-traductionnelles sont possibles. Cependant, nous ne connaissons pas les raisons ou significations biologiques des hétérogénéités observées.

Il est intéressant de noter que la grande majorité des protéines ont été identifiées directement de manière correcte comme étant des protéines de rat. Les protéines qui ont été identifiées comme homologues présentes chez d'autres espèces ont également été identifiées chez le rat mais avec un moins bon score de Mowse. La plupart des protéines

#	ID	Nom	Fonction	Animal	Rapport de volume	p (t-test)	pI	Mw	Score de Mowse	Couverture de séquence
1603	Q8BUM1	Tar DNA-binding protein-43 ^R	A	S *	-3.58	$1.60 * 10^{-7}$	6.54	34012	64	29%
1638	Q8BUM1	Tar DNA-binding protein-43 ^R	A	S *	-2.73	$7.30 * 10^{-8}$	6.54	34012	62	22%
1401	P47819	GFAP, astrocyte	D, Y	R	-6.60	$1.40 * 10^{-9}$	5.72	48782	242	50%
1400	P47819	GFAP, astrocyte	D, Y	R	-3.55	$2.00 * 10^{-5}$	5.72	48809	81	18%
1525	P07323	γ -enolase	M	R	-7.69	$7.70 * 10^{-11}$	5.03	47379	199	56%
1328	P62814	ATP synthase subunit B	M	S *	-4.37	$5.90 * 10^{-8}$	5.57	56948	92	26%
2395	O35244	Peroxi-redoxin-6	M	R	-3.24	$3.60 * 10^{-6}$	5.65	24729	144	42%
1559	P07335	Creatine kinase B-type	M	R	-2.67	$2.40 * 10^{-7}$	5.33	42970	106	30%
1953	P14152	Malate dehydrogenase	M	S *	-2.64	$2.10 * 10^{-8}$	6.13	36528	103	30%
1881	P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	M	R **	-2.63	$4.40 * 10^{-8}$	5.70	36743	97	18%
2477	P31399	ATP synthase D chain	M	R	-2.60	$1.60 * 10^{-5}$	6.21	18678	105	65%
2092	P14668	Annexin A5	M	R	-2.31	$2.30 * 10^{-6}$	5.03	35418	124	33%

Tab. 6: Protéines identifiées dont l'abondance est plus importante dans l'hippocampe de rat de 3 mois par rapport au nouveau né de 3 jours. Légende : ID = identifiant dans la base de données Swiss-Prot/UniProt; un ^R dans le nom signifie une protéine identifiée par homologie dans la bibliothèque RIKEN [29, 89]; FC = fonction (A = régulation de la transcription; C = traduction, repliement et dégradation de protéines; D = développement; G = signalisation cellulaire; M = métabolisme et énergie de la cellule; S = stress et chaperons; T = transport et trafic de vésicules; Y = cytosquelette); animal : R = rat, S = souris, H = humain (* : protéine identifiée sous le même nom chez le rat avec un moins bon score de Mowse; ** : protéine identifiée sous le même nom chez au moins un autre animal que le rat avec un même score de Mowse); pI = point isoélectrique de la protéine; Mw = poids moléculaire (en daltons); Mowse = score de Mowse [124]; "seq cov" = pourcentage de couverture de la séquence identifiée, le second chiffre représente le nombre de valeurs de masse correspondant à la protéine et le dernier le nombre total de valeurs de masse détectées dans le spectre. Voir texte pour plus de détails.

#	ID	Nom	Fonction	Animal	Rapport de volume	p (t-test)	pI	Mw	Score de Mowse	Couverture de séquence
1460	Q63081	Protein disulfide-isomerase A6	C	R	3.55	$3.60 * 10^{-9}$	5.09	47590	114	38%
1271	Q5T6W5	Heterogeneous nuclear ribonucleo-protein K (HNRNP K)	C	H *	2.68	$4.80 * 10^{-8}$	5.46	47556	102	42%
1425	Q63413	Spliceosome RNA helicase BAT1	C	R **	2.23	$2.80 * 10^{-7}$	5.44	49469	125	34%
1567	Q8BTU6	Eukaryotic initiation factor 4A-II R	C	S *	2.16	$7.20 * 10^{-7}$	5.45	41492	101	22%
1173	Q62952	Dihydropyrimidinase-related prot.3	D	R	11.96	$2.00 * 10^{-11}$	6.04	62327	227	49%
1187	Q62952	Dihydropyrimidinase-related prot.3	D	R **	4.90	$4.50 * 10^{-9}$	6.04	62327	204	36%
1172	Q62952	Dihydropyrimidinase-related prot.3	D	R **	2.69	$3.50 * 10^{-6}$	6.04	62327	149	29%
931	P47942	Dihydropyrimidinase-related prot.2	D	R **	2.18	$2.30 * 10^{-7}$	5.95	62638	75	23%
1814	Q6P6W6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α	M	R	2.76	$9.00 * 10^{-7}$	5.44	31853	67	41%
1814	Q6P6W6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α	M	R	2.76	$9.00 * 10^{-7}$	5.44	31853	67	41%
900	Q66HS4	Thop1 protein	M	R	2.27	$3.30 * 10^{-6}$	5.64	79191	195	35%
2488	P35704	Peroxi-redoxin-2	M	R	2.18	$6.90 * 10^{-7}$	5.34	21810	122	68%
1331	Q5XIM9	T-complex protein 1 subunit β	S	R	2.97	$1.10 * 10^{-5}$	6.01	57764	257	70%
607	P08113	Endoplasmic Precursor	S	S	2.49	$1.80 * 10^{-5}$	4.74	92703	263	30%
752	P34058	Heat shock protein HSP 90- β	S	R **	2.23	$7.50 * 10^{-7}$	4.97	83631	202	46%
693	P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	T	R	2.34	$2.00 * 10^{-7}$	5.14	89977	432	71%
691	P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	T	R **	2.16	$2.70 * 10^{-5}$	5.12	89847	204	35%
2132	Q66HR2	Microtubule-associated protein RP/EB	Y	R	5.43	$1.80 * 10^{-10}$	5.12	30156	79	37%
1468	Q6AYH5	Dynactin 2	Y	R	3.23	$7.60 * 10^{-8}$	5.14	44235	275	49%
1489	Q68FR6	Elongation factor 1- γ	Y	R	2.90	$2.10 * 10^{-7}$	6.33	50240	185	43%
1013	Q8C553	Lamin-B1 ^R	Y	S *	2.67	$1.40 * 10^{-7}$	5.18	47575	132	33%
2125	Q66HR2	Microtubule-associated protein RP/EB	Y	R	2.66	$1.20 * 10^{-6}$	5.12	30256	70	39%

Tab. 7: Protéines identifiées dont l'abondance est plus importante dans l'hippocampe de rats de 3 jours par rapport aux adultes de 3 mois. Même légende que la table précédente.

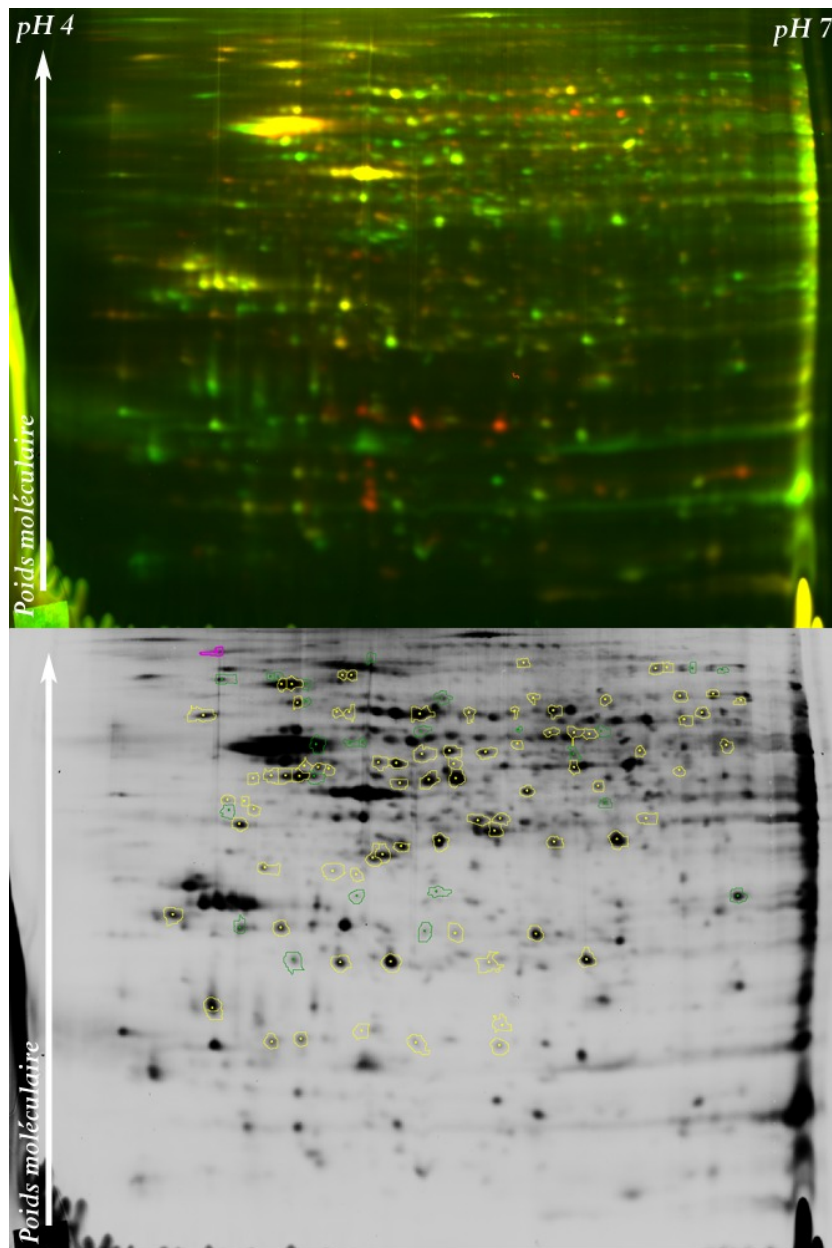


FIG. 11: Exemple de gels de protéines issues de l'hippocampe d'un rat de 3 mois (en haut, marqué au Cy3, en vert) et d'un rat de 3 jours (en haut, marqué au Cy5, en rouge). Dans l'image du même gel (1 seule couleur) en-dessous, les spots délimités par des bordures jaunes sont ceux d'intérêt qui ont été excisés et digérés et, pour certaines d'entre eux, identifiés par spectrométrie de masse. Les spots en vert sont les spots d'intérêt qui n'ont pas été soumis au séquençage.

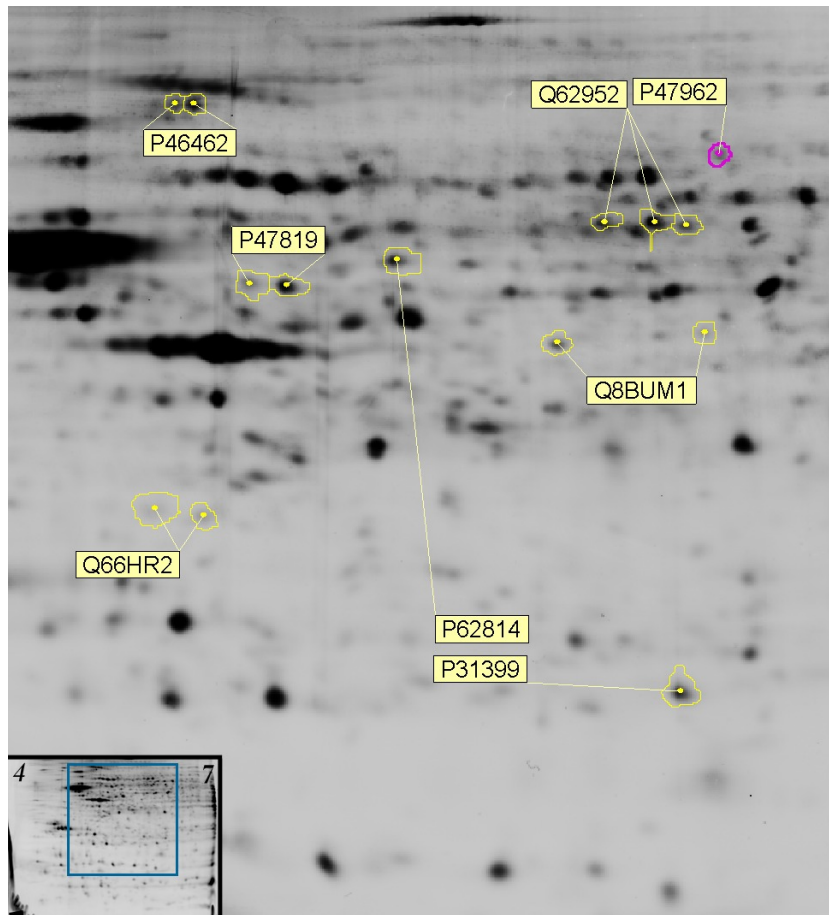


FIG. 12: Répartition des spots dont les protéines ont été identifiées avec le même nom par spectrométrie de masse (image d'un gel contenant un standard interne).

que nous avons identifiées l'ont été aussi lors de l'étude des protéines exprimées dans l'hippocampe des embryons de rat de Fountoulakis, en 1999 [61]. Elles se retrouvent également dans les mêmes catégories fonctionnelles que dans l'étude de Fountoulakis comparant les hippocampes de rats adultes et nouveaux nés [62]. Notons cependant que pratiquement aucune protéine identifiée ici ne l'a également été dans les comparaisons de Weitzdörfer entre des rats femelles de 3 jours et 3 mois [194, 195] : seules la peroxiredoxin 6 et la T-complex protein 1 sont en commun (les sens de variation d'expression sont les mêmes). Le fait que Weitzdörfer emploie des rats femelles pourrait notamment jouer un rôle dans cette différence, de nombreuses études ayant démontré de telles différences au niveau morphologique [52, 143] et au niveau d'expression de certaines protéines [122]. Une différence importante vient également du fait que le seuil de rapport de volume des études de Weitzdörfer est beaucoup plus bas que le nôtre.

Contrairement à la comparaison de Fountoulakis [62], nous ne trouvons pas de protéine exclusivement exprimée chez l'adulte ou chez le jeune rat. Cependant, la méthodologie que nous avons utilisée est à

la fois plus sensible et plus capable de mettre en évidence de faibles différences d'expression de protéines et donc de montrer que des protéines dont l'expression est diminuée même fortement dans une condition expérimentale donnée sont cependant encore exprimée. Comme dans leur étude, nous observons une grande variation d'abondance de la dihydropyrimidinase-related protein 3. Exprimée en plus grande abondance dans l'hippocampe de rat nouveau-né, cette protéine est impliquée dans la migration des neurones lors du développement du cerveau. La dihydropyrimidinase-related protein 2, de séquence proche ¹, se trouve également en plus grande abondance dans l'hippocampe du nouveau né. Cette protéine pourrait servir de repère ou de guide dans divers processus de plasticité du cerveau en développement. Elles sont les deux seules protéines impliquées spécifiquement dans le développement que nous retrouvons chez le nouveau né dans notre étude non-exhaustive.

La majorité des protéines que nous retrouvons de manière plus abondante chez le nouveau né sont des composants du cytosquelette ou jouent un rôle dans la traduction, le repliement et la dégradation des protéines ou encore dans le métabolisme et la production d'énergie de la cellule. Ces protéines contribueraient au développement et à la croissance cellulaire dans l'hippocampe des rats nouveaux nés :

1. en intervenant dans des étapes clés dans le métabolisme (HNRNP K) et l'export d'ARN messagers (spliceosome RNA helicase BAT1), patrons pour les futures protéines produites,
2. en facilitant la transcription des ARN messagers (facteur d'initiation 4A-II) [144],
3. en intervenant dans la chaîne de transfert d'électron pour la production d'ATP (NADH dehydrogenase),
4. en régulant l'oxydo-réduction dans la cellule et en médiant la transduction du signal (Peroxiredoxine-2; une autre isoforme de cette protéine (Peroxiredoxine-6) se retrouve aussi dans le tableau des protéines plus abondantes chez l'adulte, voir ci-dessous pour une discussion),
5. en remodelant la cellule et en ancrant les microtubules (MAP RP/EB), la lamina nucléaire (Lamin B1) et d'autres complexes (Elongation factor 1-γ),
6. et en permettant le transport entre le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi de ces protéines (Dynactin 2) [118].

Chez l'adulte, ce sont clairement les protéines du métabolisme énergétique de la cellule qui sont représentées de manière plus abondante. Pas moins de 6 protéines sont impliquées dans la synthèse d'ATP

¹ La comparaison des séquences d'acides aminés de DPYL2 et DPYL3 dans ClustalW 1.82 donne un score de 76 (pénalité d'ouverture = 10, pénalité d'extension = 0.2, matrice de Gonnet, fin d'ouverture = -1, distance d'ouverture = 4)

soit de manière directe (comme les ATP synthases ², la L-lactate dehydrogenase ou la créatine kinase), soit de manière indirecte. Dans cette dernière catégorie, on retrouve la γ -enolase (via la production de phosphoenolpyruvate et son implication dans la glycolyse) et la malate dehydrogenase (par son implication dans la gluconeogenèse).

De manière attendue, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est plus abondante dans l'hippocampe de rat adulte. En effet, la GFAP est une protéine de filaments intermédiaires exprimée de manière spécifique dans les cellules matures de la lignée astrogliale. Elle n'est que faiblement exprimée dans le cerveau des rongeurs durant le développement et devient plus abondante lorsqu'elle est impliquée dans d'autres fonctions astrogliales comme la mise en place de domaines cellulaires ou encore le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique.

Chez le rat adulte, nous avons identifié la Peroxiredoxin-6 et chez le nouveau né la Peroxiredoxin-2. Les séquences des deux protéines sont assez différentes ³ bien que leurs fonctions soient les mêmes (régulation de l'oxydo-réduction dans la cellule et médiation de la transduction du signal ; enzyme 1.11.1.15). Les spots correspondants dans les gels 2D étant assez éloignés (voir figure 13), il est peu probable qu'une contamination d'un des deux spots ait pu se produire lors de l'électrophorèse ou du prélèvement en vue du séquençage. Nous pouvons également exclure une mauvaise identification par la spectrométrie de masse : les scores de Mowse de ces deux protéines sont parmi les plus élevés de cette étude. Les deux formes seraient dès lors utilisées différemment dans les deux conditions, la forme 2 étant plus abondante chez le nouveau né et la forme 6 plus abondante chez l'adulte.

Les autres protéines dont l'abondance est plus importante chez l'adulte sont impliquées dans le cytosquelette (neurofilament-L et Tubulin β -2B), la régulation de la transcription (Tar DNA-binding protein-43) et le transport de vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, ainsi que l'exocytose et en particulier la libération des vésicules contenant des neurotransmetteurs aux jonctions synaptiques (α -SNAP).

3.7 CONCLUSION

En conclusion, notre étude montre qu'il n'existe pas de latéralisation de la distribution des protéines dans l'hippocampe de rats Sprague-Dawley mâles âgés de 3 mois. Cette absence de différence n'est pas due à un défaut de sensibilité de notre méthode car, utilisée pour

² Deux sous-unités différentes de l'ATP synthase ont été identifiées parmi les protéines plus abondantes chez le rat adulte. Ces deux protéines ont cependant la même activité catalytique (transport de H^+ , synthèse d'ATP et consommation d'ADP ; enzyme EC 3.6.3.14) et possèdent la même structure (un complexe catalytique périphérique et un canal membranaire à protons).

³ La comparaison des séquences d'acides aminés des peroxyredoxines 2 et 6 dans ClustalW 1.82 donne un score de 26 (pénalité d'ouverture = 10, pénalité d'extension = 0.2, matrice de Gonnet, fin d'ouverture = -1, distance d'ouverture = 4)

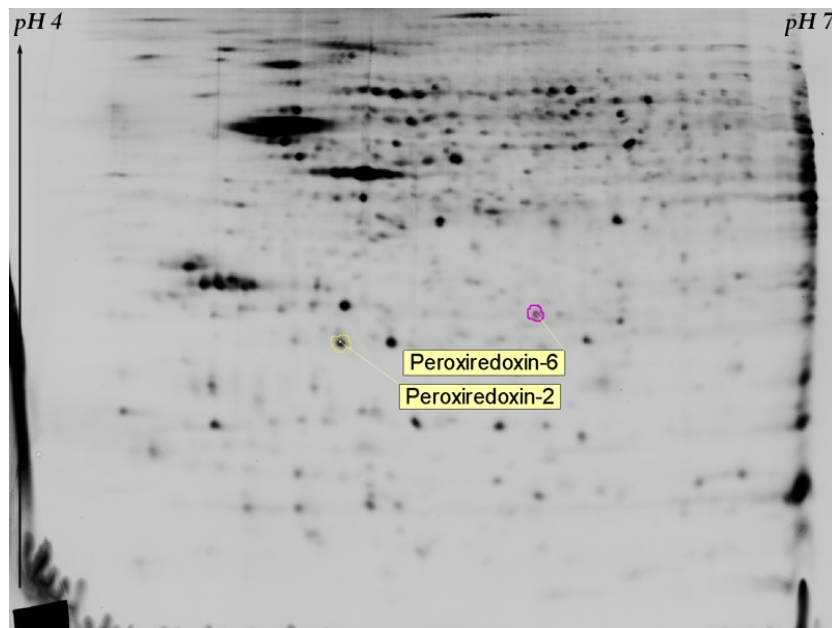


FIG. 13: Localisation des spots de Peroxi-redoxin sur un gel contenant un standard interne. La Peroxi-redoxin-2 a un poids moléculaire de 21.784kDa et un point isoélectrique de 5.34. La Peroxi-redoxin-6 a un poids moléculaire de 24.819kDa et un point isoélectrique de 5.64. Les positions des spots contenant chacune des formes correspondent à ces valeurs.

comparer des hippocampes de rats nouveaux-nés et adultes, notre étude confirme les différences d'abondances de certaines protéines. Certaines différences ont déjà été répertoriées par les équipes de Fountoulakis et Lubec [62]. La majorité des protéines que nous retrouvons en plus forte abondance chez le nouveau né contribueraient par leur fonction au développement et à la croissance cellulaire dans l'hippocampe des rats nouveaux nés. D'autre part, la majorité des protéines que nous retrouvons en plus forte abondance chez l'adulte sont impliquées dans la synthèse d'ATP, indiquant des besoins énergétiques plus importants chez l'adulte.

4.1 INTRODUCTION

La vie de nombreux animaux est gouvernée par divers rythmes biologiques, définis par des oscillations comportementales et physiologiques. Les bases de ces oscillations sont des horloges moléculaires internes qui maintiennent leur rythme même en l'absence de signaux de synchronisation externes. La mesure de ces rythmes est un outil important dans l'étude des facteurs influençant le comportement et les fonctions cérébrales. Dans ce sens, l'évaluation des activités locomotrice et générale a été utilisée comme paramètre déterminant dans de nombreux domaines de neurotoxicologie, psychopharmacologie, des rythmes biologiques, etc. La prise en compte de cette rythmicité est également importante pour la standardisation des expériences.

Par le passé déjà, de nombreuses techniques ont été utilisées pour mesurer l'activité rythmique des animaux (voir ci-dessous). Idéalement, ces techniques devraient correspondre à un certain nombre de critères bien définis dans la littérature [115, 125] :

- le comportement ou l'ensemble de comportements doit être clairement identifié et défini
 - la collecte des données ne doit pas influencer le comportement ni les variables physiologiques du rythme
 - la collecte des données ne doit pas être intrusive pour l'animal
 - les données doivent être collectées à plusieurs moments durant chaque période (augmentation du spectre de fréquence) et pendant plusieurs cycles successifs (augmentation de la résolution des fréquences)
 - la sensibilité de la technique de collecte doit être uniforme dans l'espace
 - la collecte doit être continue dans le temps et automatisée (élimination de la fatigue et de la dérive de l'observateur)
 - les données collectées, par leur représentation et leur format, doivent permettre des analyses flexibles et puissantes (transformée de Fourier, méthode de Cosinor)
 - la technique doit reposer sur une méthode simple de calibration de manière à être reproductible et stable dans le temps
 - la technique doit être validée par comparaison des données obtenues après enregistrement de la même activité d'une autre manière
- Le suivi automatique d'animaux est devenu une technique standard de laboratoire. Plusieurs méthodes automatisées ont déjà été utilisées :
- une roue dans la cage de l'animal [87, 93]

- des détecteurs de rayons infrarouges [12, 88, 169]
- des détecteurs de vibrations et autres contacts mécaniques [115]
- une cage sur stabilisateurs [139, 179]
- de la radio-téléométrie [50]
- des radars [125]
- de l’actigraphie [149]
- de l’analyse vidéo, avec [96] ou sans marqueurs [81, 173, 185]

L’utilisation de roue dans la cage de rongeurs est une des méthodes les plus utilisées, probablement pour son coût raisonnable et sa capacité d’adaptation à de nombreuses conditions environnementales. Cependant, il a été démontré que l’utilisation de la roue augmente de manière artificielle la température corporelle des rongeurs [72] et induit des changements de la période circadienne [81, 198]. De plus, les résultats obtenus ne représentent pas l’activité de l’animal lorsqu’il n’est pas dans la roue.

Une autre technique souvent utilisée consiste à placer l’animal dans une cage entourée d’émetteurs et de détecteurs de rayons infrarouges. Cette technique reflète principalement la locomotion (et non les nombreux mouvements non locomoteurs des rongeurs, par exemple) et possède une faible résolution spatiale.

Un coût élevé, des équipements compliqués à mettre en oeuvre et, surtout, l’impossibilité d’utiliser les animaux dans leurs conditions de vie habituelles empêchent les détecteurs de vibrations, les cages sur stabilisateurs et les techniques de radar et de radio-téléométrie de devenir des outils largement employés.

La reconstruction de mouvements multi-dimensionnels à partir de la localisation de marqueurs par des systèmes de suivi du mouvement est impraticable pour la mesure de l’activité générale. En effet, les marqueurs doivent être placés sur toute la surface du corps de l’animal et l’empêchent d’exprimer la totalité de son répertoire comportemental.

Finalement, une simple observation visuelle du comportement et un comptage manuel des mouvements est utile pour l’évaluation séparée des mouvements volontaires et involontaires. Cependant, cette méthode est très subjective et sujette à des différences entre examinateurs.

4.2 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Afin de quantifier l’activité générale des rats pendant des expériences de vigilance, il nous a semblé intéressant de développer une nouvelle implémentation d’un algorithme d’analyse d’images, la différence d’images bidimensionnelles (2D, two-dimensional object-difference [81]).

La méthode de différence d’images 2D quantifie les mouvements généraux d’animaux. Elle utilise une caméra vidéo et un ordinateur personnel possédant une carte d’acquisition vidéo. Des images vidéos d’un animal sont prises d’un point d’observation donné et digitalisées à

intervalles réguliers. L'idée est que la quantité générale de mouvements projetés sur une surface 2D plane peut être exprimée par la surface (càd. le nombre de pixels) de la région de l'objet changeant d'image en image. Ce principe est illustré à la figure 14.

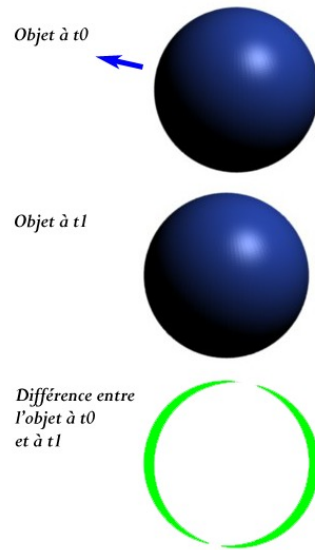


FIG. 14: Principe de la différence 2D d'images. L'objet rond et bleu se déplace devant le fond blanc (sens et direction donnés par la flèche bleue). Entre les moments t_0 (au-dessus) et t_1 (au milieu), la projection 2D de l'objet a changé. Ces modifications peuvent être calculées par soustraction d'images dont le résultat est en-dessous, représenté par les zones vertes.

Cette méthode détecte des changements subtils et rapides de mouvement global et est plus sensible et fiable que d'autres méthodes développées jusqu'à présent. Étant situés complètement en dehors de la cage de l'animal, les instruments employés ne vont pas interférer avec celui-ci. Finalement, cette méthode laisse l'animal dans son milieu habituel (même cage, même pièce).

4.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre système d'analyse d'image vidéo consiste en 3 composants (figure 15) : une caméra de surveillance fonctionnant dans le visible et l'infrarouge, un ordinateur équipé d'un tuner TV et un ensemble modulaire de logiciels.

Pour le premier composant, nous utilisons une petite caméra de surveillance (LYD-806C CCD, Lianyida, China) capable de fonctionner à l'obscurité (en infrarouge) et montée sur un trépied standard. Cette disposition permet l'ajustement en hauteur de la caméra ainsi que l'ajustement de l'angle et la distance entre la caméra et la cage de l'animal. La caméra est disposée de manière à ce que le côté le plus long de la cage de l'animal soit perpendiculaire à l'axe de la caméra. Dans cette configuration, nous pouvons mesurer les mouvements les

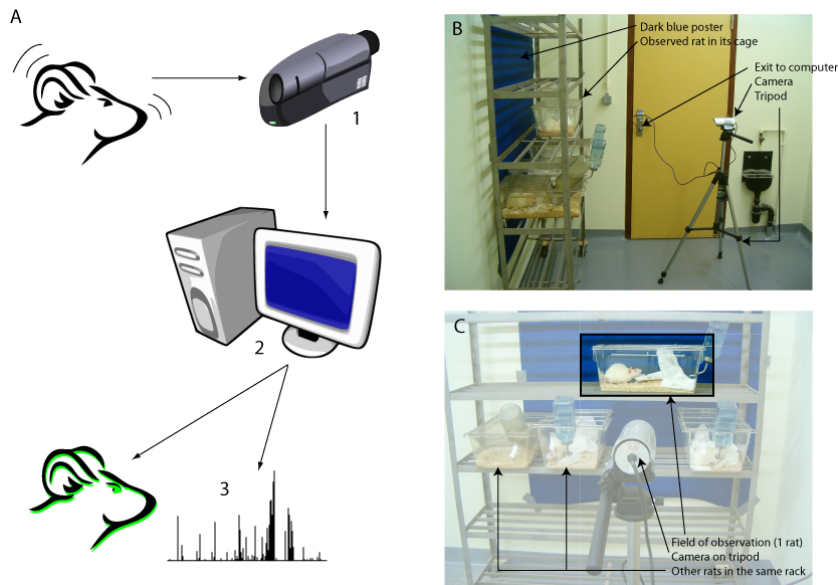


FIG. 15: Les trois composants du système d'analyse d'image vidéo : 1, caméra ; 2, ordinateur d'acquisition ; 3, logiciel d'analyse. Représentation schématique (A) et illustrations de notre installation (B et C)

plus importants de l'animal. La caméra enregistre donc de manière non-invasive tous les mouvements d'un rat dans sa propre cage.

En phase claire, la lumière est fournie par trois tubes néons de 133cm et fournissant 36W chacun de lumière blanche polychromatique. Ils produisent, au total une intensité lumineuse perçue de 260lux dans la cage (luxmètre LX-6610, Elix). En phase sombre, les 30 LEDs infrarouges de la caméra sont automatiquement allumées.

L'ordinateur de développement est équipé d'un processeur Intel Pentium II et tourne sous RedHat Linux v.7. Une carte d'acquisition d'image (Rage 128 Pro, ATI, USA) est présente dans cet ordinateur. Toute autre caméra et carte d'acquisition peut être utilisée pourvu que ces éléments soient reconnus par la bibliothèque [Video4Linux](#). Cela permet l'utilisation de webcams, caméra personnelles et autres caméras de surveillance (sans infrarouge, par exemple).

Les images de la caméra sont transmises à l'ordinateur et digitalisée par la carte d'acquisition. Notre système digitalise 25 images par seconde (25Hz). La résolution d'image est de 360 x 240 pixels (86400 pixels par image). La taille du côté d'un pixel est de 0.133cm à 1 mètre de distance.

Le logiciel développé a été conçu selon un principe de modularité. Chaque module peut être utilisé séparément. De plus, les résultats de chacun des modules sont décrits et peuvent être utilisés par tout autre processus personnalisé. Un avantage de cette technique est qu'en lançant le même module dans différents processus, notre système peut aisément être étendu à l'analyse de plusieurs animaux simultanément. Les modules ont été développés en C et sont soumis à la "GNU General

Public Licence". La documentation, les fichiers d'exemple, le code source et les fichiers binaires sont disponibles librement sur le site web du projet : <http://bioinformatics.org/gemvid/>.

La procédure formelle de calcul informatique est la suivante :

1. une image en niveaux de gris est acquise à une certaine fréquence, avec une résolution déterminée ;
2. l'intensité de l'ensemble des pixels de l'image nouvellement acquise est comparée à celle des pixels de l'image précédente ;
3. un filtre passe-haut est appliqué aux pixels dont l'intensité de gris change afin d'éliminer le bruit inhérent à l'acquisition (câbles coaxiaux, connexions, ...);
4. le nombre de pixels dont l'intensité de gris change et est supérieure à la valeur du filtre est enregistré dans un fichier ;
5. ces pixels sont superposés à l'image analysée.

Notre premier module logiciel acquiert les images et compare chacune d'entre elle avec l'image précédente. Le nombre de pixels modifiés entre deux images successives ainsi que le moment auquel la seconde image a été prise (en heure, minutes, secondes et millisecondes) sont associés. Notre système traite 25 comparaisons d'images par seconde (25Hz, aussi rapidement que les images lui arrivent).

Ce premier module montre ensuite la zone d'observation en temps réel et superpose un calque mettant en évidence les pixels modifiés en vert. Ainsi, une première utilisation de ce module permet de visualiser les changements comportementaux en temps réel.

Un signal peut également être envoyé à l'opérateur ou dans l'environnement du rat si la quantité de mouvement descend sous un seuil défini par l'utilisateur pour un intervalle de temps (lui aussi défini par l'utilisateur). Ce signal peut être, par exemple, un stimulus visuel (sur l'écran d'ordinateur) et/ou auditif (via les haut-parleurs).

Les résultats numériques du premier module sont envoyés sur la sortie standard : tous les 25ème de seconde, une chaîne contenant le temps et le nombre de pixels modifiés (comparés à l'image précédente) est envoyée à la ligne de commande. Le nombre de pixels modifiés est une mesure indirecte de l'activité générale du rat. Cette information permet de quantifier les changements intervenus en temps réel.

Via une redirection, les données issues du premier module peuvent être enregistrées dans un fichier texte. Le format de sortie peut aisément être modifié pour stocker les données dans d'autres formats. La longueur d'une période d'acquisition continue de données est seulement limitée par la taille du disque dur. Dans sa version actuelle, une journée d'acquisition est stockée dans un fichier de 80Mo (6Mo si le fichier est compressé avec gzip).

Les données peuvent être traitées plus tard, par un second module logiciel. Le module actuel trace des actogrammes, indiquant l'intensité

relative d'activité générale du rat (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse). D'autres analyses peuvent être réalisées par tout logiciel d'analyse mathématique ou statistique (Matlab ou R, par exemple).

Finalement, deux autres paramètres peuvent être définis : une valeur minimale (filtre passe-haut) et maximale (filtre passe-bas). La valeur minimale définit le nombre minimal de pixels modifiés pouvant être comptabilisé comme mouvement. Dans notre configuration expérimentale, nous définissons une valeur de filtre passe-haut à 100 pixels, correspondant approximativement à un carré de 2cm^2 . Aucun nombre maximal de pixel n'est défini dans notre expérience.

4.3.1 Expérience 1 : sensibilité et reproductibilité

Dans une première expérience, nous avons testé la sensibilité et la reproductibilité de notre appareil par la détection de la fréquence de mouvement d'un petit objet en mouvement régulier. Nous plaçons un métronome (aktell Piccolino, Wittner, Germany) à une distance d'un mètre de la caméra et nous enregistrons une série d'oscillations à différentes fréquences (40, 52, 100, 152 et 200 oscillations par minute). Chaque enregistrement dure 60 secondes. Nous appliquons une transformée de Fourier de courte durée (*short-time Fourier transform* dans Matlab R2006a, Mathworks) au signal enregistré pour en extraire les fréquences observées. Nous effectuons également un test de corrélation de Pearson (*Pearson's product-moment correlation test* dans R 2.3.1 [140]) entre les fréquences théoriques et celles observées.

4.3.2 Expérience 2 : stabilité dans le temps

Dans une seconde expérience, nous laissons le métronome (à 52 oscillations par minute) devant notre système pendant 10 heures. Puisque le signal du métronome est stable dans le temps, nous testons ici la stabilité de notre système. Nous appliquons également une transformée de Fourier de courte durée afin de comparer les spectrogrammes obtenus au début du test et à la fin du test. Cette procédure nous permet de détecter toute dérive potentielle du signal dans le temps, induisant de fausses augmentations ou diminutions du mouvement.

4.3.3 Expérience 3 : sensibilité et comparaison avec d'autres systèmes

Dans l'expérience 3, nous nous intéressons à la sensibilité de notre système et nous comparons nos données avec celles obtenues à partir d'un appareil bien établi de suivi de l'activité. Sur un mobile spécialement conçu lancé à deux vitesses différentes ($23.81\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ et $45.45\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), nous plaçons un actimètre (Actiwatch Plus de Cambridge Neurotechnology Ltd) et un carré de carton blanc de surface variable. Ce papier

est placé perpendiculairement à l'axe de la caméra. Nous enregistrons des séries de mouvements du mobile à différentes vitesses et avec différentes surfaces (80, 128, 160, 192, 224 and 256 cm²). Cette gamme de surface a été choisie parce qu'elle entoure l'aire occupée par la projection d'un rat vu latéralement sur une surface verticale (approximativement 150cm²). Nous reportons les données obtenues par notre système et l'actimètre sur le même graphique. Un test de corrélation de Pearson est également appliqué aux signaux enregistrés avec différentes surfaces.

4.3.4 *Expérience 4 : sensibilité avec animaux*

Les expériences 4 à 6 ont été réalisées sur 8 rats Sprague-Dawley mâles, pesant entre 200 et 250g au moment de l'observation. A leur arrivée dans l'animalerie, ils sont logés en groupe et ont un accès illimité à l'eau et à la nourriture. Sept jours avant leur observation, les rats sont logés individuellement dans de plus petites cages (18cm de haut x 29cm de large x 20cm de profondeur), l'eau et la nourriture étant toujours en accès illimité. La pièce est maintenue à une température de 22-24°C et à une humidité relative de 30-40%. Toutes les procédures sont approuvées par le Comité d'Éthique de l'Université de Liège.

De manière à maintenir un certain niveau de bien être animal durant l'expérience, le rat est laissé dans sa propre cage, à la même place dans le portoir et avec un peu de matériel d'enrichissement de l'environnement. Une surface bleu foncée est pendue au mur derrière la cage. Cette surface fournit assez de contraste avec les rats blancs en lumière visible.

La veille du premier jour d'observation, la caméra est placée à approximativement 2m de distance du fond de la cage. Le cadre d'observation contient la totalité de la cage.

Dans l'expérience 4, nous testons la sensibilité de notre appareil avec des animaux ainsi que le type de mouvements qu'il peut effectivement détecter. L'acquisition des données débute simultanément à un enregistrement sur cassette vidéo synchronisé (AG-VP320, Panasonic). Ensuite, la séquence vidéo est rejouée et nous comparons la quantité de pixels changés avec le comportement observé.

4.3.5 *Expérience 5 : animaux en rythme circadien et stabilité dans le temps*

Dans l'expérience 5 (6 rats), un cycle de lumière de 12h est imposé avec les lampes s'allumant automatiquement à 6h et s'éteignant à 18h (L :D 12 :12), en synchronisation avec l'horloge de l'ordinateur. Les rats sont laissés sans perturbation pour les 7 jours suivants avec eau et nourriture à volonté, sauf au jour 3 pour un changement de litière et un supplément éventuel en eau et nourriture. Les données sont collectées

automatiquement de manière continue pour la totalité de la période, sauf pour les quelques minutes de changement de litière. Les données sont ensuite analysées. Notre analyse des données inclut la création d'actogrammes et un test de stabilité dans le temps. Avec ce dernier test, nous vérifions qu'il n'y a pas de dérive temporelle du système de détection. Pour ce faire, nous calculons le nombre moyen de pixels modifiés par heure. Les moyennes entre les jours et les conditions (lumière/obscurité) sont comparées avec une ANOVA dans R.

4.3.6 *Expérience 6 : animaux en cycle continu*

Dans l'expérience 6, les 2 rats sont placés dans les mêmes conditions que dans l'expérience 5 à l'exception du cycle de lumière. Ce dernier est gardé en constante obscurité (D :D 12 :12, 0lux) à partir du premier jour d'observation.

4.4 RÉSULTATS

4.4.1 *Expérience 1 : sensibilité et reproductibilité*

Dans une première expérience, nous avons testé la sensibilité et la reproductibilité de notre système pour la détection de la fréquence d'un mouvement d'un petit objet en mouvement régulier. L'analyse des enregistrements d'oscillations d'un métronome à différentes fréquences a permis de retrouver les valeurs de ces fréquences avec notre appareil. La figure 16 (A-C) montre le résultat d'une analyse spectrale pour une fréquence : 200 oscillations par minutes (ou 3.333Hz). A la figure 16 (D), nous traçons un graphe représentant les fréquences observées (en ordonnée) en fonction des fréquences théoriques (en abscisse) définies sur le métronome (de 0.66 à 3.3Hz). Le coefficient de corrélation de Pearson est 0.9992245 ($p < 2.20 * 10^{-16}$), indiquant que les fréquences observées ne sont pas statistiquement différentes des fréquences théoriques.

4.4.2 *Expérience 2 : stabilité dans le temps*

Dans une seconde expérience, nous laissons le métronome (à 52 oscillations par minutes) devant notre système pendant 10 heures. A la figure 17, nous montrons deux spectrogrammes issus des oscillations observées du métronome réglé à 52 oscillations par minute (8.86667Hz), au début et à la fin des 10 heures. La comparaison des deux spectrogrammes montre qu'il n'y a pas de dérive du signal détecté après 10 heures : le coefficient de variation de la fréquence observée principale durant le premier quartile est de 0.32701% et est de 0.57637% durant le dernier quartile.

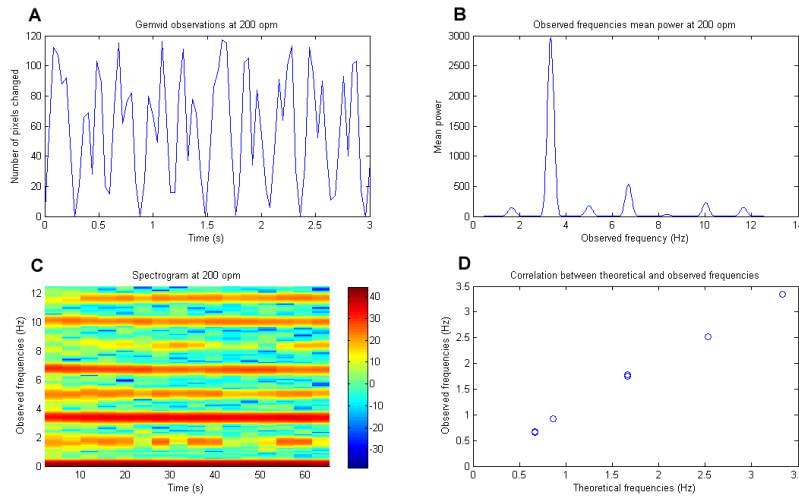


FIG. 16: Observations et analyses spectrales d'un balancier de métronome réglé à 200 oscillations par minutes. A : observations réalisées par le premier module logiciel. B : puissance moyenne des fréquences observées; 3.35Hz est la fréquence ayant le maximum de puissance moyenne (200 oscillations par minutes correspond à 3.333Hz). C : spectrogramme des fréquences observées en fonction du temps (échelle d'intensité sur la droite; opm = oscillations par minutes). D : graphique de corrélation entre les fréquences observées et théoriques ($n = 24$).

4.4.3 Expérience 3 : sensibilité et comparaison avec d'autres systèmes

Dans l'expérience 3, nous nous intéressons à la sensibilité de notre système et réalisons la comparaison de nos données avec celles obtenues grâce à un appareil de suivi de l'activité : l'Actiwatch. Cette comparaison montre que les deux appareils fournissent des données similaires. Cependant, notre système détecte l'activité d'un mobile en mouvement avant l'Actiwatch (voir exemple de deux mouvements d'un mobile à la figure 18, A). Trois facteurs ont rendu cette comparaison difficile :

1. la résolution de l'Actiwatch est faible : sa période est de 2s alors que celle de notre système est de 0.04s ;
2. les mouvements observés sur ce type de configuration expérimentale se trouvent dans la gamme inférieure de sensibilité de l'Actiwatch ;
3. finalement, l'Actiwatch ne peut détecter que des variations de vitesse du mouvement ("activité") alors que notre système détecte également les variations de la quantité de mouvement (nombre de pixels modifiés, voir section suivante).

Nous avons également comparé le nombre de pixels modifiés en utilisant différentes surfaces se déplaçant devant notre système. A la figure 18, B, nous reportons le nombre moyen de pixels modifiés en ordonnées et les différentes surfaces mobiles en abscisse. Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0.9511966 ($p < 10^{-7}$), indiquant que la

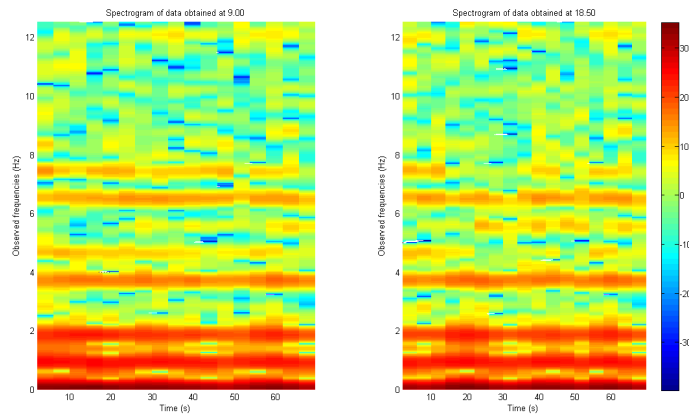


FIG. 17: Analyse spectrale de deux périodes d'acquisition de données d'un métronome réglé à 52 oscillations par minute (0.8667Hz) dans une expérience continue. A gauche : spectrogramme d'une minute de données acquises à 9h00. A droite : spectrogramme d'une minute de données acquises à 18h50.

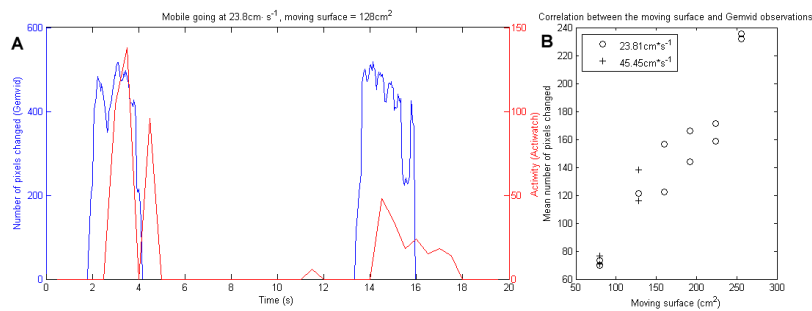


FIG. 18: Comparaison des données d'observation d'un module de 128cm^2 se déplaçant à $23.8\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. A : données observées pour deux appareils (Gemvid en bleu, Actiwatch en rouge). B : graphique de corrélation entre la taille de la surface déplacée et le nombre moyen de pixels modifiés ($n = 3$ pour chaque valeur d'aire).

taille de la projection bidimensionnelle d'un objet en mouvement (à la même vitesse) est significativement liée au nombre de pixels qui sont modifiés.

4.4.4 Expérience 4 : sensibilité avec animaux

Dans l'expérience 4, nous testons la sensibilité de notre appareil avec des animaux ainsi que le type de mouvements qu'il peut effectivement détecter. Nous observons que notre système est très sensible, même aux très petits mouvements de la tête ou de la queue d'un rat calme (figure 19, à gauche). Lors que les rats dorment, aucun mouvement n'est détecté (figure 19, à droite).

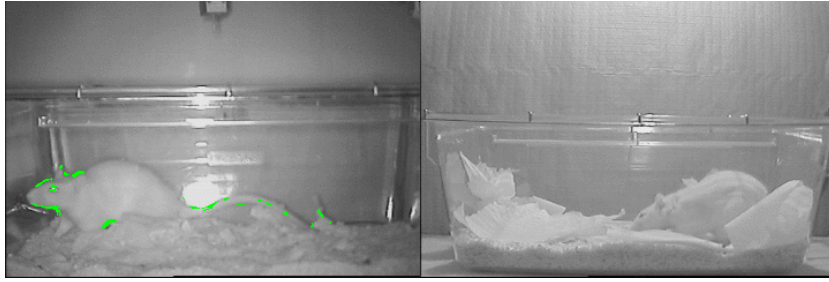


FIG. 19: Capture d'écran montrant ce que présente le premier logiciel. Les pixels en vert mettent en évidence les zones modifiées entre l'image actuelle et l'image précédente ; dans ce cas, les mouvements mis en évidence sont seulement observés autour de la tête et de la queue. A gauche, le rat est calme mais actif ; à droite : le rat dort.

4.4.5 Expérience 5 : animaux en rythme circadien et stabilité dans le temps

Dans l'expérience 5, six rats sont laissés sans perturbation pendant 7 jours sous un cycle L :D 12 :12. Un exemple d'actogramme issu du second module logiciel est présenté à la figure 20. Les actogrammes sont des graphiques du nombre de pixels modifiés (en ordonnée) en fonction du moment de la journée (en abscisse). Notons que le rat 3 (séries d'actogrammes de la figure 20, en-dessous à gauche) montre un motif d'activité intéressant : pour une raison inconnue, son activité augmente de manière récurrente aux alentours de midi. Aucun des autres rats n'a montré ce motif d'activité et rien dans l'environnement ne pourrait expliquer ce comportement spécifique.

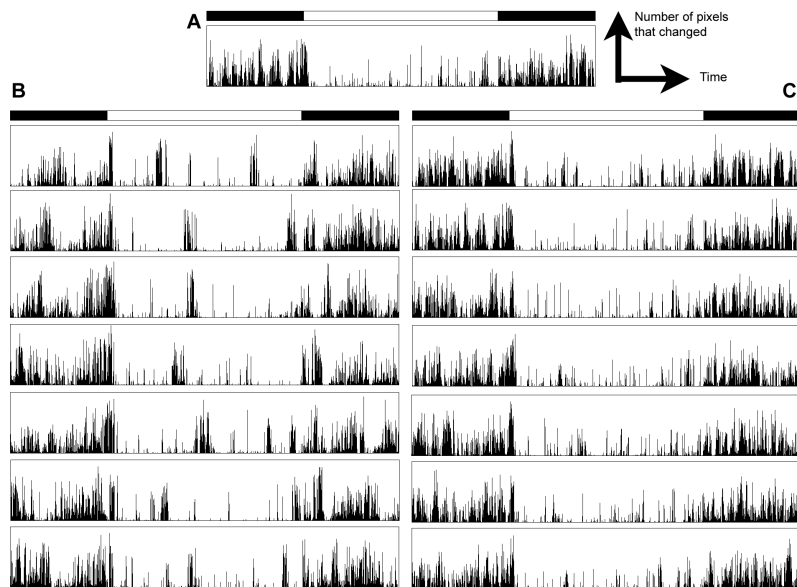


FIG. 20: Exemples d'actogrammes issus du second module logiciel. Au-dessus : 24h d'activité du rat 1 (L :D 12 :12 avec lumières allumées à 6h00). En-dessous : sept jours d'activité pour le rat 3 (à gauche) et le rat 6 (à droite).

Finalement, nous avons reporté sur un graphique le nombre de pixels modifiés chaque jour pour un rat (figure 21). Une ANOVA montre qu'il y a une différence significative entre les conditions de luminosité et d'obscurité ($p < 0.001$), comme attendu. Par contre, il n'y a pas d'effet significatif du jour ni dans l'interaction entre le jour et la condition ($p < 0.05$). Ceci indique qu'il n'y a pas de dérive temporelle dans notre système de détection.

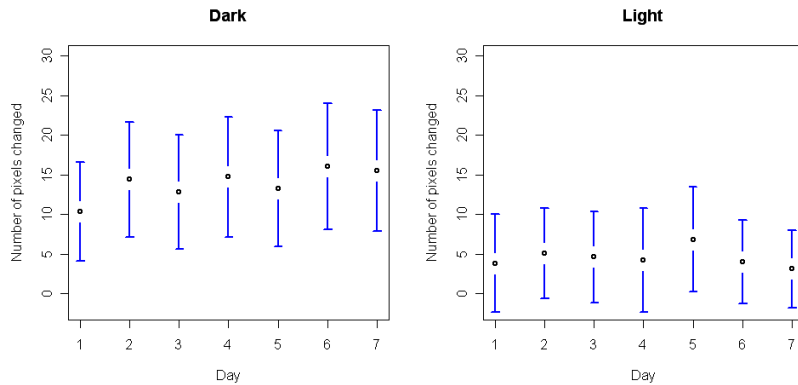


FIG. 21: Graphiques du nombre moyen de pixels modifiés par jour (à gauche, en condition d'obscurité ; à droite, en condition de lumière).

4.4.6 Expérience 6 : animaux en cycle continu

Dans l'expérience 6, deux rats sont placés dans des conditions constantes d'obscurité (D :D 12 :12, olux) pendant 7 jours. La figure 22 compare les activités du même rat durant une journée L :D 12 :12 et durant une journée D :D 12 :12. En conditions L :D, le rat réduit drastiquement son activité à 6h24 (24 minutes après que les lumières soient allumées) et devient très actif juste après que les lampes soient éteintes (à 18h00). Après quatre jours d'obscurité complète (condition D :D), le rat réduit drastiquement son activité à 10h02 (près de 4h après la chute d'activité initiale) et devient très actif à 19h44 (près de 2 heures après que les lumières se soient éteintes dans la configuration précédente).

4.5 DISCUSSION

Ce chapitre décrit un système se basant sur la différence 2D d'images (*two-dimensional object-difference* [81]). Le principe de cette méthode est que la quantité globale de mouvement d'un objet pendant une période donnée peut être exprimée par la somme de l'aire projetée en 2D par cet objet qui est modifiée d'image en image successives durant l'intervalle mesuré. Nous démontrons que notre système Gemvid effectue une acquisition exacte, stable et très sensible de cette quantité de mouvement.

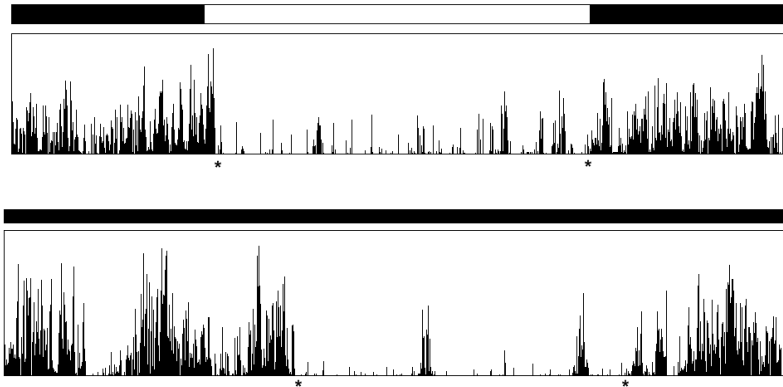


FIG. 22: Activité d'un rat en conditions L :D et D :D. Au dessus : troisième jour en conditions L :D. En dessous : cinquième jour en condition d'obscurité constante (D :D). Une astérisque (*) indique un changement important d'activité moyenne sur une période de 10 minutes).

Afin de démontrer la validité du système, nous l'avons d'abord testé avec un métronome donnant un mouvement régulier et stable. Nous montrons que le système est assez sensible pour détecter de petits mouvements de métronome à 1 mètre de distance. De plus, les données acquises permettent de mesurer exactement la fréquence d'oscillation fixée sur le métronome. Nous démontrons qu'il n'y a pas de dérive temporelle de notre processus de détection puisque les données observées contiennent les mêmes fréquences d'oscillations durant au moins 10 heures. Finalement, nous montrons que lors de l'enregistrement d'animaux, le nombre moyen de pixels modifiés par jour ne change pas de manière significative.

Nous avons comparé notre système à un système de mesure d'activité déjà validé par de nombreuses études, l'Actiwatch. En dépit des facteurs limitant liés à l'Actiwatch, les deux systèmes enregistrent l'activité en même temps. De plus, nous montrons également qu'avec notre système, il y a une forte corrélation entre le nombre moyen de pixels modifiés et la taille d'une surface se déplaçant à une vitesse constante.

Afin de tester le système avec des animaux, des rats ont été observés en conditions L :D et D :D. Les résultats de l'expérience 4 montrent que les rats ont une activité plus grande durant les périodes sombres que durant les périodes de lumière, comme attendu pour un animal nocturne. Notre système est aussi capable de détecter des changements dans la longueur de la période circadienne endogène. En effet, le *Rattus norvegicus* a une période de plus de 24 heures qui devient apparente en conditions sans entraînement (obscurité constante dans notre cas).

Nous avons surmonté la limitation classique du traitement vidéo en utilisant une caméra nous permettant d'observer l'activité d'un rat de manière continue, tant durant les phases d'obscurité que durant les phases de lumière, grâce à l'utilisation automatisée d'un capteur infrarouge.

Trois désavantages sont cependant toujours présents avec cette technique :

1. pour détecter précisément un mouvement dans les trois dimensions, au moins deux caméras, de l'équipement et des calculs plus compliqués sont requis. Avec une seule caméra, une partie de l'information tri-dimensionnelle est inévitablement perdue lors de notre analyse bi-dimensionnelle. Cependant, par la combinaison appropriée d'une seule caméra et le positionnement de la cage de l'animal, des résultats pratiquement équivalents à une analyse 3D peuvent être obtenus. Par exemple, nos cages sont placées de telle manière à avoir la longueur perpendiculaire à l'axe de la caméra. De plus, les rongeurs se déplacent le plus fréquemment le long de la plus longue partie de la cage.
2. une partie de la litière déplacée par le rat durant ses activités de grattage peut parfois être comptabilisée comme mouvement global. Ce problème pourrait être résolu en incluant une étape de segmentation juste avant la soustraction d'image. Cette étape délimiterait une zone d'intérêt limitée au rat observé.
3. finalement, notre système ne peut enregistrer l'activité que d'un rat à la fois. Cette limitation peut être contournée par l'ajout d'une étape de segmentation. Cette segmentation diviserait l'image en zones correspondant à différentes cages de différents rats. Une autre solution serait également de lancer autant de processus de détection qu'il y a d'animaux/caméras dans l'expérience.

En résumé, cette méthode possède de nombreux avantages :

- tous les instruments utilisés sont disponibles sur le marché à très bas prix (un ordinateur à base de processeur Pentium II peut être trouvé pour moins de 80 euros et notre caméra coûte 70 US\$) ;
- la procédure d'analyse est réalisée automatiquement, aucune compétence particulière de l'opérateur n'est requise ;
- puisqu'il est placé en dehors de l'environnement de l'animal, le système de collecte de données n'influence pas de variables physiologiques de l'animal ;
- contrairement aux réalisations préalables hashimoto99, togasakio5, le stockage d'images pour traitement ultérieur n'est qu'optionnel : notre système est capable de traiter les images en temps réel ;
- les mouvements globaux des animaux peuvent être estimés de manière sensible ;
- notre système peut être aisément étendu à l'observation simultanée de plusieurs animaux ;
- les données acquises permettent des analyses diverses et leur intégration dans d'autres systèmes d'analyse (via l'utilisation de formats ouverts).

Ces avantages font de Gemvid un système puissant pour l'évaluation du mouvement global de rongeurs.

4.6 ARTICLE

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Circadian Rhythms [134]. Cette publication est disponible en annexe [A.1](#).

ETUDE PROTÉOMIQUE DE L'HIPPOCAMPE ET DES GLANDES SURRÉNALES DE RAT SUITE À UNE PRIVATION DE SOMMEIL DE COURTE DURÉE

5.1 INTRODUCTION

Le sommeil est présent chez toutes les espèces de vertébrés étudiées jusqu'à présent. Cette omniprésence suggère que le sommeil doit avoir une ou plusieurs fonctions vitales chez ces animaux [146, 65]. Il a ainsi été associé à des fonctions aussi diverses que la thermorégulation [109], la conservation de l'énergie [16], la défense immunitaire [58], la restauration tissulaire [1] et la plasticité du cerveau [47, 190].

Une manière d'aborder les fonctions du sommeil est d'évaluer les effets que sa privation entraîne sur les réponses comportementales et physiologiques tant au niveau de l'organisme, qu'au niveau des tissus et des cellules. Plusieurs études de transcriptomique ont permis d'identifier un certain nombre de gènes qui sont exprimés de manière différente durant l'éveil et le sommeil (voir par exemple [33, 137]). Toutefois, les changements physiologiques des propriétés cellulaires résultent de la transcription de gènes suivie de leur traduction et d'une synthèse de protéines. En conséquence, la caractérisation des changements protéiques contribuant au phénotype cellulaire est un complément indispensable aux études de génomique dans la compréhension du lien entre l'activité cellulaire et le comportement.

A notre connaissance, une seule étude protéomique des effets de la privation de sommeil a été publiée jusqu'à présent. En utilisant une approche d'électrophorèse 2D classique, Basheer et ses collègues ont étudié les niveaux d'expression des protéines dans le prosencéphale basal de rat après 6 heures de privation de sommeil par manipulation douce [9]. Dans cette analyse, 89 spots ont montré une différence d'abondance d'au moins 2 fois entre les rats privés de sommeil pendant 6 heures et les contrôles au sommeil non perturbé. Le fait que plusieurs protéines identifiées lors de cette étude appartiennent au cytosquelette ou soient associées à la fonction synaptique suggère que des changements dans la transmission ou la plasticité synaptique pourraient se produire après 6 heures de privation de sommeil dans l'aire du prosencéphale basal de rat contrôlant le sommeil.

5.2 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Puisque l'hippocampe joue un rôle important dans la mémoire spatiale [22], tant chez les humains [32] que chez les rongeurs [105], et que la privation de sommeil est connue pour perturber le processus de consolidation de la mémoire [162], notre objectif sera d'identifier les changements de niveaux d'abondance de protéines dans l'hippocampe de rat après une courte période (4 heures) soit de sommeil soit de privation totale de sommeil par manipulation douce. Comme l'hippocampe est également la cible d'hormones de stress [107], nous mesurerons ce stress par des indices classiques de stress [155] (ulcération de l'estomac, hypertrophie des glandes surrénales et perte de poids corporel). Nous étudierons également les changements protéomiques dans les glandes surrénales de rat après 4 heures de privation de sommeil car les glandes surrénales sont également physiologiquement affectées par la privation de sommeil [5].

5.3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Des rats Sprague-Dawley mâles pesant 170-220g au début de l'expérience sont élevés et acclimatés à l'animalerie comme décrit précédemment. Tous les rats sont pesés avant et après expérience.

Dans un premier groupe, les rats ($n = 9$) sont privés de sommeil par manipulation douce [66]. Les animaux sont continuellement observés durant 4 heures au début de la période d'illumination. La privation de sommeil est réalisée par perturbation de la litière autour du rat, par le toucher des vibrisses avec un petit pinceau et le toucher de la fourrure avec ce même pinceau lorsque le rat adopte une posture de sommeil [40]. Dans un second groupe, les rats ($n = 9$) sont laissés non perturbés durant ces 4 heures.

La vigilance des rats est surveillée de deux manières : à l'aide d'un programme automatisé d'enregistrement de l'activité, Gemvid [134] et par une évaluation visuelle du comportement. Les états de vigilance suivant sont définis : sommeil/repos, mouvement, se nourrir, se laver, grattage et exploration de l'environnement. Pour chaque rat, les niveaux de vigilance sont déterminés durant la période lumineuse précédant l'expérience. Lors de l'expérience, des scores inférieurs à ceux déterminés précédemment sont considérés comme du repos ou du sommeil. Le comportement du rat est également noté lors de son observation (logiciel développé dans notre laboratoire, voir section C.2). Le logiciel nous permet de quantifier le nombre et la durée des périodes de repos/sommeil ainsi que le nombre et la fréquence des réveils forcés pour les rats privés de sommeil. Les analyses statistiques (ANOVA, tests de Tukey et Kruskal-Wallis) sont réalisées avec Statistica 7.1 (Statsoft).

L'extraction des protéines d'hippocampes et de glandes surrénales de rat a été réalisée comme décrit précédemment (voir section 2.7.1). Leur marquage et séparation électrophorétique par la technique du 2D-DIGE a également déjà été décrite précédemment à la section 2.7.2. Après digitalisation, les images des gels sont analysées avec le logiciel DeCyder. Les spots montrant une variation d'abondance statistiquement significative d'un facteur supérieur à 1.2 (test t de Student, $p < 0.05$) et un volume minimal de 25000 sont sélectionnés pour analyses complémentaires et identification par spectrométrie de masse (voir protocoles à la section 2.7.8).

Afin de confirmer la présence de certaines protéines ainsi que les différences observées entre niveaux d'abondance, des western blots après électrophorèse uni-dimensionnelle sont réalisés avec les mêmes échantillons que ceux de l'analyse protéomique précédente. L' α -SNAP et la NSF ont été détectées dans les extraits protéiques d'hippocampe avec des anticorps monoclonaux de souris (respectivement **ab16391**, concentration 1 μ g/ml et **ab16681**, dilution 1/2000, Abcam). La glucose-6-phosphate déshydrogenase dans les glandes surrénales a été détectée avec un anticorps polyclonal de lapin (**ab993**, dilution 1/1000, Abcam). Le protocole de western blotting est décrit à la section 2.7.9.

5.4 RÉSULTATS

5.4.1 *Privation de sommeil*

Le comportement des rats a été observé durant 4 heures au début de la période lumineuse. La durée moyenne de comportement noté comme sommeil chez les rats non perturbés est de 144.6 ± 56.8 minutes. Les rats privés de sommeil n'ont jamais dormi durant les 4 heures de privation de sommeil. Les rats non perturbés n'ont pas été réveillés alors que les rats privés de sommeil ont été réveillés 80.8 ± 22.5 fois en moyenne durant les 4 heures. La figure 23 montre le nombre d'interventions requises pour prévenir la survenue du sommeil par intervalles consécutifs de 30 minutes. Le nombre d'interventions augmente progressivement durant les 2 premières heures et reste alors à un niveau élevé (à l'exception du cinquième intervalle, c.à.d. la période de 2.00 à 2.30). Une ANOVA à un critère pour des mesures répétées révèle un effet significatif du facteur "intervalle" ($p < 0.05$). Un test post-hoc (test de Tukey) révèle une augmentation significative dans le nombre d'interventions entre la première demi-heure et les quatrième à huitième ainsi qu'entre la seconde demi-heure et les septième et huitième intervalles.

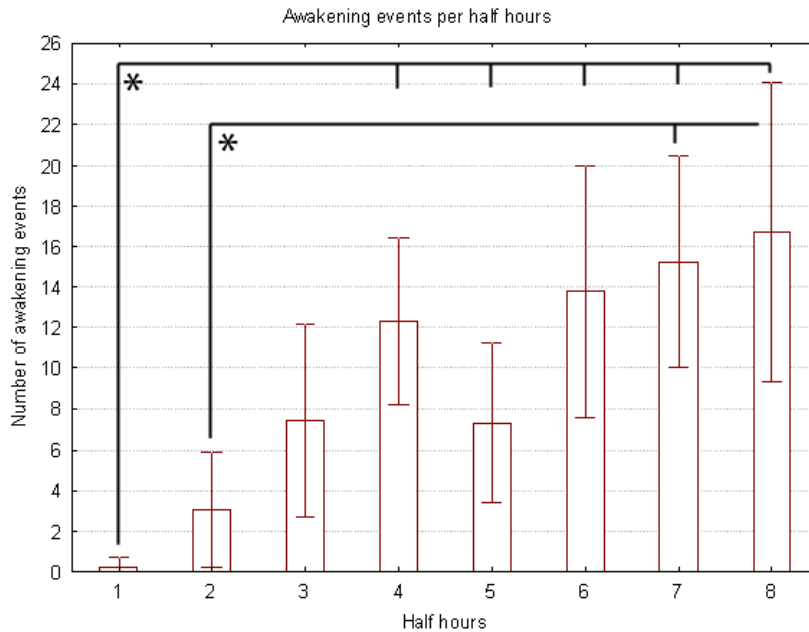


FIG. 23: Nombre d'interventions requises pour prévenir le sommeil, groupées par intervalles de 30 minutes consécutives. Des différences significatives sont observées entre les intervalles 1-4 et 2-7-8.

5.4.2 Indices de stress

Les rats ont été sacrifiés immédiatement après les 4 heures de sommeil ou de privation de sommeil. Le cerveau entier, l'hippocampe, l'estomac et les glandes surrénales ont été enlevés, pesés et stockés à -80°C . L'estomac a été ouvert et, après son observation minutieuse, nous n'avons pas pu trouver d'ulcération. Le poids des glandes surrénales a été comparé entre les rats privés de sommeil et les rats non perturbés et aucune différence significative n'a été trouvée (test de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Le poids des rats n'a pas changé significativement non plus entre les deux groupes (test de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

5.4.3 Etude comparative du profil protéique des hippocampes par 2D-DIGE et identification des protéines régulées chez les rats privés de sommeil et non perturbés

Les protéines d'hippocampe ont été extraites, marquées soit au Cy-Dye Cy3 ou Cy5 et séparées par électro-focalisation entre les pH 4 et 7 (première dimension). Après réduction et alkylation, les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse en SDS-PAGE. Après digitalisation des images des gels, les distributions bi-dimensionnelles des protéines d'hippocampe ont été analysées. La figure 24 montre une carte bi-dimensionnelle représentative du protéome d'hippocampe de rat privé de sommeil. Le marquage des protéines aux CyDyes combiné à une détection automatisée des spots permet

la visualisation d'environ 4000 spots individuels sur un gel 2D. Le profil des protéines hippocampiques de rats privés de sommeil ($n = 6$) est globalement très similaire à celui de rats non perturbés ($n = 6$). Cependant, après appariement des spots dans les 6 paires d'images, 87 spots ont montré une variation significative entre les conditions sommeil et privation de sommeil : 64 spots sont régulés positivement d'un facteur 1.2 à 2.94 suite à la privation de sommeil alors que 23 spots sont régulés négativement d'un facteur 1.2 à 2.74. Des 16 spots sélectionnés envoyés au spectromètre de masse MALDI-TOF, nous avons identifié de manière non ambiguë 12 protéines par PMF. Leurs noms, numéros d'accession, changements d'abondance relative et d'autres données de spectrométrie sont résumés dans le tableau 8.

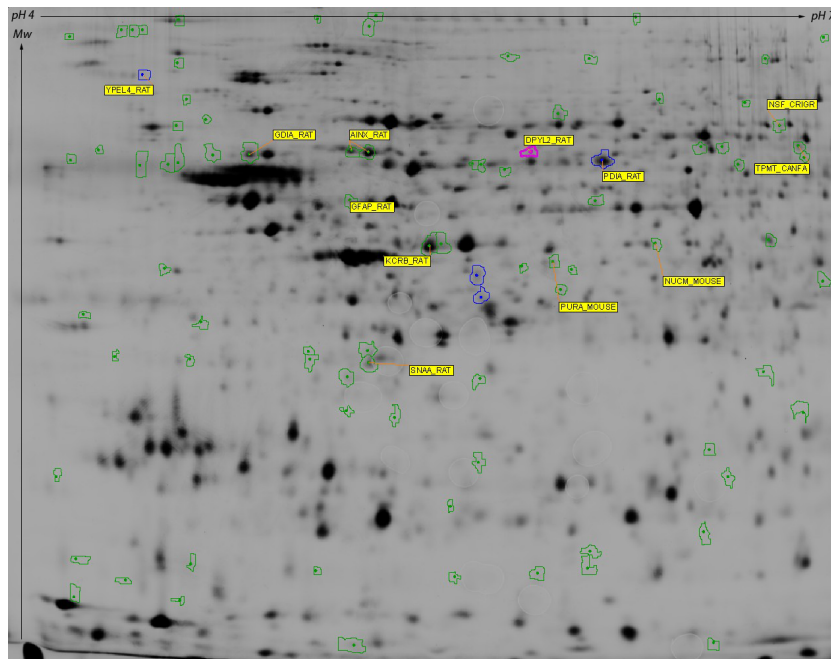


FIG. 24: Carte bi-dimensionnelle représentative du protéome d'hippocampe de rat privé de sommeil entre les pH 4 et 7. Les spots délimités correspondent à des protéines d'intérêt qui ont été excisées pour identification par spectrométrie de masse. Les numéros d'identification (ID) des protéines du tableau 8 sont indiqués dans les étiquettes jaunes.

5.4.4 Etude comparative du profil protéique des glandes surrénales par 2D-DIGE et identification des protéines régulées chez les rats privés de sommeil et non perturbés

Nous avons ensuite examiné l'effet de l'exposition des rats à 4 heures de privation de sommeil sur le protéome des glandes surrénales. Tout comme pour les protéines hippocampiques, le profil des protéines de glandes surrénales de rat après 4 heures de privation de sommeil ($n = 4$) est globalement similaire à celui des protéines de glandes surrénales de rat non perturbé ($n = 4$). Cinquante sept spots montrent une

#	ID	Nom	Fonction	Rapport de volume	p (<i>t-test</i>)	pI	Mw	Score de Mowse
1169	AINX_RAT	α -internexin	Y	-1.52	$8.20 * 10^5$	5.2	56253	108
1166	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	D	-1.64	0.012	5.95	62638	100
1192	GDIA_RAT	Rab GDI α	G	-1.31	0.045	5	51074	100
1489	GFAP_RAT	Glial fibrillary acidic protein	Y	-1.35	0.04	5.35	49970	90
1781	KCRB_RAT	Creatine kinase type B	M	-1.26	0.045	5.33	42970	236
971	NSF_MOUSE	Vesicle fusing ATPase	T	-1.33	0.0067	6.52	83083	68
1753	NDUS2_MOUSE	NADH ubiquinone oxidoreductase	M	-1.22	0.012	6.52	52991	69
1230	PDIA3_RAT	Protein disulfide isomerase A3	C	+1.83	0.033	5.88	57044	100
1869	PURA_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur- α	A	-1.23	0.025	6.07	34976	54
2462	SNAA_RAT	α -soluble NSF attachment protein	T	-1.37	0.017	5.3	33627	107
1131	TPMT_CANFA	Thiopurine S-methyltransferase	C	-1.42	0.0071	6.46	28752	87
532	YPEL4_RAT	Protein yippeee-like 4	?	+1.53	0.036	8.42	14762	44

Tab. 8: Protéines hippocampiques dont l'abondance diffère entre les conditions expérimentales avec identifiant de Swiss-Prot et informations d'analyse et d'identification. Dans la colonne "Fonction", A = régulation transcriptionnelle, C = traduction protéique, repliement et dégradation, D = développement, G = signalisation, M = métabolisme cellulaire et énergie, S = stress, chaperon, T = transport et trafic vésiculaire, Y = cytosquelette. Dans la colonne "Rapport Moyen", un nombre négatif correspond à une protéine plus abondante après 4 heures de privation de sommeil (par rapport à 4 heures de sommeil). Le rapport moyen représente le rapport entre les abondances moyennes de la protéine dans les deux conditions (n = 6), tel que calculé par le logiciel DeCyder. Autres abréviations : pI = point iso-électrique théorique, Mw = poids moléculaire théorique, score de Mowse tel que défini par Pappin et al. [124].

variation significative d'abondance relative après 4 heures de privation de sommeil, comparées à l'absence de perturbation : 18 spots sont plus abondants (d'un facteur 1.21 à 1.62) alors que 39 spots sont moins abondants (d'un facteur 1.20 à 4.72). Des 16 spots sélectionnés envoyés au spectromètre de masse MALDI-TOF, nous avons identifié de manière non ambiguë 13 protéines (par PMF et MS/MS). Leurs noms, numéros d'accession, changements d'abondance relative et d'autres données de spectrométrie sont résumés dans le tableau 9.

5.4.5 *Western blots*

Dans le but de confirmer la validité des données quantitatives obtenues lors de notre analyse protéomique, nous avons effectué des analyses en western blots quantitatifs multiplex en fluorescence sur plusieurs échantillons.

Pour l'hippocampe, nous avons exposé les protéines extraites après séparation par SDS-PAGE à des anticorps dirigés contre l' α -SNAP et la NSF. Après une analyse tenant compte des variations de chargement des échantillons révélées par le signal d'actine, le rapport de l'abondance de NSF entre les conditions de sommeil et de privation de sommeil est de -1.28 (similaire à la valeur -1.33 obtenue par analyse 2D-DIGE ; figure 25, à gauche). Le rapport d'abondance d' α -SNAP entre ces deux conditions est de -1.15 (similaire à la valeur -1.37 obtenue par analyse 2D-DIGE ; figure 25, à droite).

Après séparation des protéines de glandes surrénales par 1D-SDS-PAGE, nous avons exposé ces protéines à l'anticorps dirigé contre la glucose-6-phosphate déshydrogenase. Après incubation avec un anticorps secondaire fluorescent ECL Plex et digitalisation, la présence et l'abondance de la protéine a été analysée (figure 26). Après analyse du volume des spots en tenant compte des variations de chargement des échantillons révélées par le signal d'actine, le rapport de glucose-6-phosphate déshydrogenase entre les conditions de sommeil et de privation de sommeil est de -1.47 (similaire à la valeur de -1.49 obtenue par analyse 2D-DIGE).

5.5 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons pu identifier, par analyse protéomique, 31 protéines dont l'abondance est modifiée dans les hippocampes ou les glandes surrénales après 4 heures de privation de sommeil par manipulation douce, en comparaison à une période similaire de sommeil. La plupart des protéines identifiées dans l'hippocampe sont plus abondantes après une courte privation de sommeil qu'après un sommeil normal. Ce résultat est en accord avec les études de génomique dans lesquelles la privation de sommeil induit la surexpression de certains

#	ID	Nom	Fonction	Rapport de volume	p (t-test)	pI	Mw	Score de Mowse
1372	G6PD_RAT	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	M	-1.49	0.0097	5.97	59375	103
2107	A1M_RAT	alpha-1-macroglobulin	M	-1.27	0.018	6.42	167125	166
2744	CLIC4_RAT	Chloride intracellular channel protein 4	T	-1.25	0.046	5.93	28502	-
1525	Q4KLG7_RAT	Serine hydroxymethyltransferase 1	M	+1.23	0.047	6.96	38106	241
2912	STAR_RAT	Steroidogenic acute regulatory protein	A	+1.24	0.016	8.93	31501	141
1151	ALBU_RAT	Serum albumin	M	+1.27	0.041	5.80	65916	45
1032	GRP78_RAT	Heat shock 70kD protein 5	T	+1.28	0.034	5.01	70475	302
1438	SYDC_RAT	Aspartyl-tRNA synthetase	C	+1.31	0.0042	6.02	57126	348
2038	NDUAA_RAT	NADH dehydrogenase 1 alpha	M	+1.71	0.048	5.96	36843	98
1503	AL9A1_RAT	Aldehyde dehydrogenase family 9, subfamily A1	M	+1.79	0.027	7.94	54327	236
1551	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase precursor	M	+1.93	0.031	5.69	54368	344
1361	CES3_RAT	Carboxylesterase	M	+2.05	0.029	6.00	60054	180
1537	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase precursor	M	+2.32	0.021	5.69	54368	482

TAB. 9: Protéines de glandes surrénales dont l'abondance diffère entre les conditions expérimentales (n = 4) avec identifiant de Swiss-Prot et information d'analyse et d'identification. Toutes les protéines ont été identifiées par PMF à l'exception d'une, sans score de Mowse, qui a été identifiée par MS/MS. Même notes que dans le tableau 8.

ARN messagers dans l'hippocampe [34] : la plupart des gènes sont constamment surexprimés durant l'éveil ou après une privation de sommeil de courte durée suivant l'éveil, par rapport à des périodes semblables de sommeil [33]. De manière surprenante, la plupart des protéines identifiées dans les glandes surrénales sont plus abondantes après un sommeil normal qu'après une courte privation de sommeil. Il faut cependant noter que la présence de niveaux plus importants de protéines dans un état comportemental par rapport à un autre peut ne pas être due à une augmentation du taux de traduction mais peut provenir d'une réduction de la dégradation de protéines, de modifications post-traductionnelles de ces protéines ou d'une combinaison de ces événements. La technique de 2D-DIGE employée dans ce travail, ne permet pas de distinguer ces possibilités bien qu'elle permette la détection de subtiles différences d'abondance de protéines.

Par l'utilisation d'une méthode d'immunoblotting quantitative multiple en fluorescence, nous avons pu confirmer de manière précise les différences d'abondances de la NSF et l' α -SNAP dans l'hippocampe ainsi que la G6PD dans les glandes surrénales de rat.

Dans la discussion qui suit, les protéines dont l'abondance est plus importante chez le rat non perturbé ont des rapports d'abondance positifs alors que les protéines dont l'abondance est plus importante après privation de sommeil ont des rapports d'abondance négatifs.

5.5.1 *Identification de protéines dans l'hippocampe de rats privés de sommeil*

Dans l'hippocampe des rats privés de sommeil, les protéines montrant une plus grande abondance participent à cinq fonctions principales : le métabolisme cellulaire, les voies biochimiques de l'énergie, celles du transport et du trafic vésiculaire, le cytosquelette et le métabolisme des protéines (traduction, repliement et dégradation). Il nous semble important de noter qu'aucune protéine liée à la réponse de stress n'a été identifiée dans l'hippocampe alors que les gènes de réponse cellulaire au stress sont régulés positivement après 3 à 8 heures d'éveil spontané [33].

Toutes les fonctions attribuées aux protéines dont l'abondance augmente après la privation de sommeil requièrent de l'énergie. Une augmentation de l'expression de gènes liés au métabolisme énergétique dans des conditions de privation de sommeil a déjà été montrée dans la littérature [36]. Nos résultats suggèrent une adaptation rapide des neurones et/ou des cellules gliales à une augmentation de la demande métabolique liée à l'éveil par rapport au sommeil [36]. Ils sont également en accord avec l'hypothèse d'une augmentation de la demande d'énergie éventuellement liée à une augmentation progressive de la force synaptique lors de l'éveil prolongé [174] bien qu'aucune des

protéines identifiées dans ce travail ne soit le produit de marqueurs génétiques de la potentialisation synaptique [35].

C'est ainsi que deux enzymes centrales dans le métabolisme énergétique cellulaire ont été identifiées. La créatine kinase (rapport de -1.26), une enzyme majeure du système de phosphotransfert cellulaire, joue un rôle central dans la fourniture d'énergie dans les tissus à grande demande énergétique (comme le muscle squelettique, le coeur, le cerveau et les spermatozoïdes) [191]. Elle agit de concert avec d'autres systèmes enzymatiques pour faciliter la communication énergétique intracellulaire (système créatine kinase/phosphocréatine de "transport spatial d'énergie" [191]) et elle est responsable du maintien des niveaux de phosphocréatine, une réserve importante d'énergie [90]. La créatine kinase est une protéine cytoplasmique également exprimée dans la mitochondrie alors que la NADH ubiquinone oxidoréductase (ou Complexe I, rapport de -1.22) n'est exprimée que dans cette dernière. La NADH ubiquinone oxidoréductase catalyse l'oxydation du NADH, la réduction de l'ubiquinone et la translocation de $4H^+$ à travers la membrane mitochondriale interne pour finalement amener une synthèse d'ATP [82].

L'augmentation de l'abondance de la Rab GDI α (rapport de -1.31), de la vesicle fusing ATPase (NSF) (rapport de -1.33) et de l' α -soluble NSF attachment protein (α -SNAP) (rapport de -1.37) dans l'hippocampe suggère un changement dans la régulation du transport et du trafic de vésicules et plus spécialement l'arrimage et la dissociation des vésicules à leurs organelles-cibles. En tant que protéines interagissant avec le complexe SNARE, l' α -SNAP et la NSF jouent un rôle central dans la spécificité de l'amarrage entre une vésicule et sa membrane cible [176]. Après l'amarrage de la vésicule, la NSF va dissocier les t-SNARE et v-SNARE et, ainsi, contrôler le moment et la localisation de la fusion des membranes. Finalement, la Rab GDI α est un facteur important dans le contrôle de Rab et, ainsi, de la spécificité du transport vésiculaire. En se liant à Rab, libéré après la fusion de membranes, Rab GDI empêche Rab de se défaire de sa molécule de GDP avant qu'elle n'ait interagit avec les protéines appropriées sur la membrane cible [49, 154]. Cette augmentation de l'abondance de protéines impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire pourrait sous-tendre une augmentation générale d'activité synaptique reflétant l'augmentation de l'activité motrice et du niveau d'alerte ou une réaction à une situation stressante induite par la privation de sommeil. De manière intéressante, plusieurs auteurs ont trouvé une augmentation semblable de la transcription de gènes dans le cortex cérébral de rats non perturbés (calcineurine, CaMKIV et la famille de gènes Rab, voir [37, 78]).

L' α -SNAP est aussi la seule protéine de notre étude à être liée à la β -soluble NSF attachment protein, (β -SNAP) trouvée par Basheer et al. dans la seule autre étude protéomique des effets d'une privation de sommeil publiée jusqu'à présent [9]. Ces deux protéines sont très

similaires en séquence et ont les mêmes fonctions dans la cellule. Cependant, l'abondance de l' α -SNAP augmente après la privation de sommeil dans notre étude alors que l'expression de la β -SNAP diminue après une privation de sommeil chez Basheer. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que les changements impliquant des protéines régulatrices après privation de sommeil peuvent se produire en différentes directions dépendant des besoins précis des synapses. De plus, nous utilisons une durée de privation différente et étudions une aire différente du cerveau que celle étudiée par Basheer et ses collègues.

La privation de sommeil augmente l'abondance d'au moins deux protéines liées à la fonction du cytosquelette, au développement neuronal et à la plasticité synaptique : l' α -internexine et la GFAP. L' α -internexine (un composant des filaments intermédiaires, rapport de -1.52) est un marqueur des tissus neuronaux et une protéine critique pour le développement neuronal [59]. Ainsi, cette augmentation d'abondance dans l'hippocampe de rat après une courte privation de sommeil indiquerait la présence de nouveaux neurones ou leur modification morphologique afin de s'adapter à une possible potentialisation synaptique [174]. Tant son importance pour l'axone et la vitesse de conduction nerveuse que sa corrélation avec les niveaux de transporteurs de glutamate dans le cerveau compromis au niveau énergétique [199] donne à l' α -internexine un rôle potentiel dans l'homéostasie de l'énergie. D'autres études ont également montré qu'elle était régulée positivement après un exercice volontaire [54] de la même manière que l'augmentation de l'expression des gènes liés à la LTP durant l'exploration intensive [86]. Globalement, cette plus grande abondance d' α -internexine semble en accord avec l'hypothèse d'homéostasie synaptique [174]. Ici, puisque la durée de l'épisode de privation de sommeil est probablement trop court pour provoquer la prolifération neuronale, le changement d'abondance de l' α -internexine pourrait simplement être du à des modifications post-traductionnelles liées à la plasticité synaptique.

La Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (rapport de -1.35) est un composant majeur du cytosquelette des astrocytes et est généralement utilisé comme marqueur d'astrocytes matures [57]. La GFAP contrôle la motilité et la forme des astrocytes en fournissant une stabilité structurelle aux extensions des processus astrocytaires. Cependant, de nouveau, la durée de l'épisode de privation de sommeil est probablement trop courte pour provoquer la prolifération astrocytaire. L'augmentation d'abondance de GFAP observée dans un spot pourrait alors indiquer un effet de la privation de sommeil sur la fonction cognitive et la plasticité synaptique. En effet, puisque tant l'évasion inhibitrice (*inhibitory avoidance*) que l'habituation altèrent la phosphorylation *in vitro* de la GFAP [152], la modification d'abondance de GFAP observée ici pourrait refléter des modifications post-traductionnelles similaires sous-tendant des changements d'activité et/ou d'efficacité synaptique induits par une situation stressante.

La dihydropyrimidinase-related protein 2 (rapport de -1.64) joue un rôle important dans la spécificité et l'élongation axonale par la régulation de l'assemblage des microtubules, l'endocytose des molécules d'adhésion, la réorganisation des filaments d'actine et le trafic des protéines de l'axone [200]. Dans le cerveau adulte, l'expression de la dihydropyrimidinase-related protein 2 est significativement diminuée [31]. Cependant, elle reste exprimée dans des structures qui retiennent leur capacité de différenciation et de plasticité ainsi que dans une sous-population d'oligodendrocytes. Une hypothèse serait que cette protéine pourrait être impliquée dans la plasticité neuronale de l'hippocampe durant la privation de sommeil.

Finalement, comme la transcriptional activator protein Pur- α a été impliquée dans diverses fonctions cellulaires, incluant l'activation et la répression de la transcription, la traduction et la croissance cellulaire [69], son augmentation d'abondance (rapport de -1.23) pourrait indiquer une augmentation de la transcription et la traduction de l'ADN, compatible avec une augmentation générale de l'activité cellulaire. Cela pourrait indiquer le début d'un processus de régulation génique durant la courte période de privation de sommeil, conduisant éventuellement à une transcription plus large de l'ADN au cas où la durée de privation de sommeil augmente.

5.5.2 *Identification de protéines dans l'hippocampe de rats non privés de sommeil*

De manière intéressante, seulement deux protéines présentent une abondance relative plus importante en sommeil qu'en privation de ce dernier. Parmi celles-ci, la disulfide isomérase A3 (rapport de +1.83) est également exprimée en plus grande quantité dans le coeur lors de l'ischémie, une autre forme de stress [150]. Elle module l'état redox du réticulum endoplasmique (RE) et permet un contrôle de l'homéostasie du Ca^{2+} dans le RE [126]. Cependant, ses deux rôles principaux sont la catalyse de la formation des ponts disulfure, l'isomérisation des protéines et l'inhibition de leur agrégation [196]. Les ponts disulfures jouent un rôle majeur dans le repliement et la stabilité de nombreuses protéines. Comme différents auteurs suggèrent une implication du sommeil dans la synthèse protéique [37], une augmentation de l'activité de la disulfide isomérase A3 pourrait indiquer son implication dans le contrôle du repliement correct des protéines nouvellement synthétisées. Cette proposition appelle cependant deux réserves. Tout d'abord, puisque les épisodes de sommeil de notre expérience sont courts, la disulfide isomérase A3 pourrait plutôt être impliquée dans la réactivation de protéines précédemment inactivées, un processus qui permettrait de rétablir des concentrations de protéines actives de manière plus rapide qu'une néosynthèse de protéines suite à la traduction de gènes

liées au sommeil [33]. Deuxièmement, nous n'affirmons pas que le sommeil promeut de manière générale la traduction, le repliement et la dégradation des protéines. En effet, la thiopurine S-méthyltransférase (rapport de -1.42) joue également plusieurs rôles dans le repliement des protéines en fonction de son polymorphisme, catalyse la S-méthylation Ado-Met dépendante de la thiopurine [193] et est plus abondante dans l'hippocampe après privation de sommeil.

Egalement présente en plus grande abondance dans l'hippocampe de rats non perturbés, YPEL4 (rapport de 1.53) est une protéine dont le gène est hautement conservé et exprimé dans divers organismes eukaryotes [85]. Cela suggère qu'elle devrait jouer un ou plusieurs rôles importants dans la maintenance de la vie. De plus, sa localisation cellulaire (i.e. en association avec le centrosome ou le fuseau mitotique) suggère une fonction dans la division cellulaire. Cependant, sa fonction réelle n'a pas encore été découverte.

5.5.3 *Privation de sommeil et l'effet confondant du stress*

Le nombre de manipulations requises afin de prévenir la survenue du sommeil augmente avec le temps dans nos expériences, démontrant une augmentation de la propension au sommeil. Le taux d'interventions atteint un plateau après 3 heures, à un moment où la propension au sommeil du rat est à son plus haut point [20]. Ce résultat est consistant avec une étude précédente selon laquelle trois heures de privation de sommeil déclenchent la régulation homéostatique du sommeil, mise en évidence par les épisodes ultérieurs de rebond de sommeil [172].

Un point important de l'interprétation de ces résultats est d'estimer si l'augmentation d'abondance de certaines protéines est associée avec l'éveil ou est plutôt une conséquence du stress. Afin de répondre à cette question, nous avons caractérisé les effets du stress à deux niveaux. Tout d'abord, au niveau macroscopique, rien n'indiquait que la privation de sommeil était stressante : nous ne pouvons pas observer d'ulcération de l'estomac, d'hypertrophie des glandes surrénales ou de perte de poids chez nos rats. Cela pourrait sembler logique car la durée de stress est probablement trop courte pour induire ces réponses typiquement observées après 72 heures [39]. Ensuite, à un niveau moléculaire, nous avons caractérisé les profils protéomiques dans les glandes surrénales de rats privés de sommeil.

5.5.4 *Identification de protéines de glandes surrénales chez les rats non privés de sommeil*

De manière intéressante, nous trouvons plus de protéines dont l'abondance augmente dans les glandes surrénales de rat non privés de sommeil par rapport aux glandes surrénales de rats privés de sommeil. Ceci

montre une tendance opposée à ce que nous avons trouvé dans l'hippocampe. La plupart des protéines identifiées dans les glandes surrénales comme étant plus abondantes chez les rats non perturbés appartiennent à des voies métaboliques cellulaires. Elles catalysent la transformation d'esters carboxyliques (carboxylestérase, rapport de +2.05), d'aldéhydes (aldéhyde déshydrogénase, rapports de +1.93 et +2.32), de triméthylaminobutyraldéhyde (aldéhyde déshydrogénase famille 9, sous-famille A1, rapport de +1.79) et les sérines (sérine hydroxyméthyltransférase, rapport de +1.23). Une protéine est également spécifiquement impliquée dans la synthèse d'ATP : la NADH déshydrogénase 1 α (rapport de +1.71). Cette augmentation possible de production d'ATP pourrait être utilisée avantageusement par l'augmentation d'activité métabolique dans les voies citées plus haut.

Certaines protéines identifiées sont impliquées dans l'assemblage de protéines et la régulation de la transcription. Dans le cytoplasme, l'aspartyl t-RNA synthase (rapport de +1.31) assemble la L-aspartyl et un t-RNA en consommant de l'ATP. Dans le réticulum endoplasmique, la protéine 5 de choc thermique de 70kDa (GRP78 ; rapport de +1.28) facilite l'assemblage de complexes protéiques multimériques. En étant impliquée dans diverses étapes métaboliques et dans divers compartiments cellulaires, l'augmentation d'abondance de ces protéines indique une augmentation dans la transcription de protéines. Et, finalement, dans la mitochondrie, la protéine steroidogenic acute regulatory protein (rapport de +1.24) augmente le transport de cholestérol et sa transformation en pregnenolone, une hormone stéroïde intermédiaire dans la synthèse de progestérone, androgènes et oestrogènes, entre autres [114]. L'ensemble des protéines identifiées contribuent à une vision du sommeil comme un mécanisme de rétablissement des niveaux d'énergie [16] et des stocks [65] disponibles.

Finalement, la sérum albumine (rapport de +1.27), la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin, peut être considérée ici comme un artefact expérimental.

5.5.5 *Identification de protéines de glandes surrénales chez les rats privés de sommeil*

Un autre argument en faveur de l'absence de stress physiologique dû à la privation de sommeil par manipulation douce pendant 4 heures est le nombre relativement petit de protéines dont l'abondance augmente dans les glandes surrénales de rats privés de sommeil. Cependant, une protéine importante est identifiée dans ce groupe : la glucose-6-phosphate dehydrogenase (rapport de -1.49). Cette enzyme catalyse la première étape de la phase oxydative de la voie métabolique du pentose phosphate. Elle est ainsi impliquée dans la synthèse de NADPH qui

pourrait contrer le stress oxydatif généré à la suite de la privation de sommeil [106].

Le stress pourrait également être un facteur important dans la plus grande abondance de la chlorure intracellulaire channel protein 4 (rapport de -1.25). En effet, les canaux chlore sont importants pour le maintien d'un volume cellulaire adéquat et le potentiel de repos de la membrane [157]. Ces deux facteurs importants peuvent être modifiés par le stress au niveau cellulaire.

L' α -macroglobuline (rapport de -1.27) est une protéine largement exprimée et qui inhibe les protéinases [23]. Sa présence ici peut être expliquée par le fait qu'elle est également un inhibiteur de la coagulation et pourrait être ainsi traitée comme un artefact plutôt que comme une protéine avec une fonction physiologique précise.

5.6 CONCLUSIONS

Par l'utilisation d'une approche protéomique, cette étude a démontré qu'une privation de sommeil de courte durée affecte différents réseaux de protéines, principalement liés au métabolisme cellulaire, aux voies biochimiques de l'énergie, des transports, du trafic vésiculaire, du cytosquelette et du traitement des protéines (traduction, repliement et dégradation) dans l'hippocampe, une région du cerveau jouant un rôle central dans la cognition. L'augmentation globale d'abondance de ces protéines dans la condition de privation de sommeil indique une activation générale d'un grand nombre de mécanismes cellulaires impliqués dans la maintenance de l'éveil, du métabolisme énergétique et, peut-être, de certaines fonctions cognitives. L'utilisation d'une méthode d'immunoblotting couplé aux CyDyes nous permet de confirmer de manière quantitative les différences d'abondance de certaines protéines, tant dans l'hippocampe que dans les glandes surrénales de rats.

Bien que nous n'ayons pas observé de signe de stress comportemental, une différence d'abondance de certaines protéines a été observée dans les glandes surrénales de rats privés de sommeil par rapport à ceux non perturbés. Cette tendance est en opposition avec celle observée dans l'hippocampe où plus de protéines montraient une abondance relative plus grande dans la condition non perturbée, comparé à la condition de privation de sommeil. Ce résultat contribue à une vision du sommeil comme un mécanisme de restauration de l'énergie [16] et des stocks de molécules disponibles [65].

Une question intéressante ressort de ces observations : comme la privation de sommeil interagit, au niveau moléculaire, avec les processus cognitifs puisque la privation de sommeil perturbe le traitement de traces mnésiques récentes [102] et étend les effets de la potentialisation synaptique aux processus homéostasiques suivants [174]. Il serait éga-

lement intéressant d'étudier les différences d'abondances protéiques à différents moments de la privation de sommeil.

5.7 ARTICLE

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Proteome Research [135]. Cette publication est disponible en annexe [A.2](#).

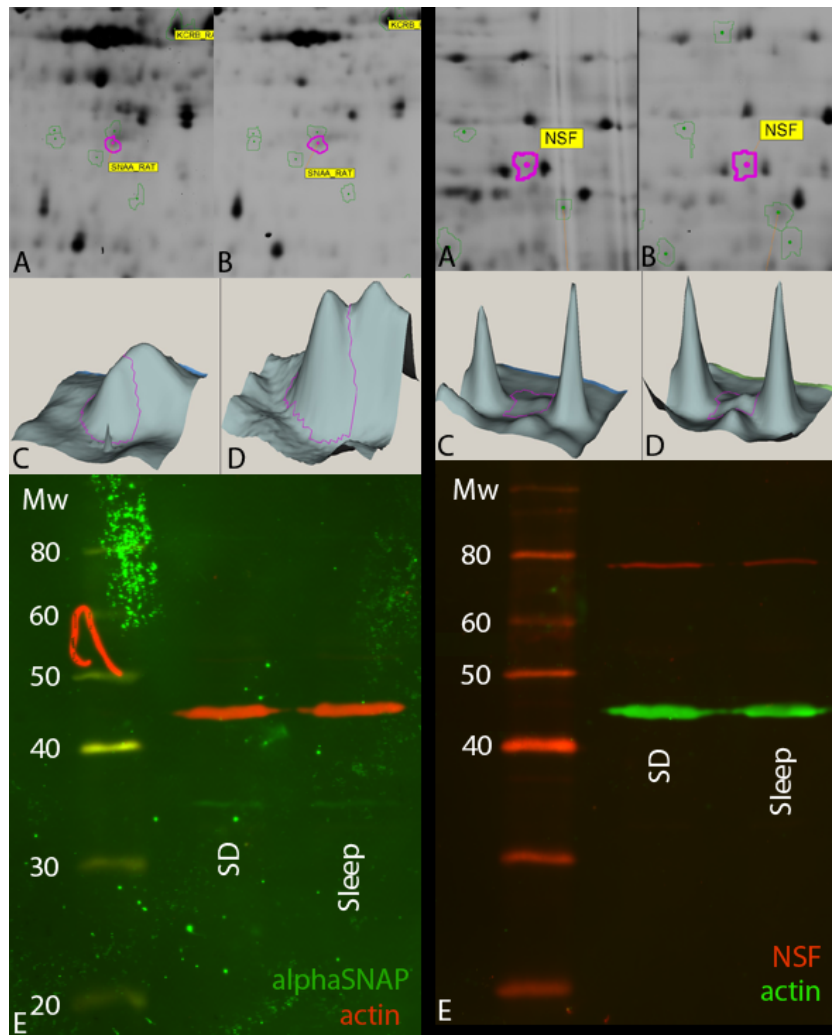


FIG. 25: Régions de gel 2D représentatives (A, B), visualisation 3D des spots dont le contour est en mauve (C, D) et western blots (E) pour NSF (ensemble d'images de gauche) et α -SNAP (ensemble d'images de droite). Le rapport moyen issu de l'analyse 2D-DIGE du spot contenant la NSF est de -1.33 ($n = 9$); le rapport moyen de volume de bande de l'analyse du western blot est de -1.28 ($n = 3$). Le rapport moyen issu de l'analyse 2D-DIGE du spot contenant l' α -SNAP est de -1.37 ($n = 9$); le rapport moyen de volume de bande de l'analyse du western blot est de -1.15 ($n = 3$). Pour tous les western blots, les variations de chargement de l'échantillon révélées par le signal d'actine est pris en compte dans le calcul du rapport moyen de volume de bande.

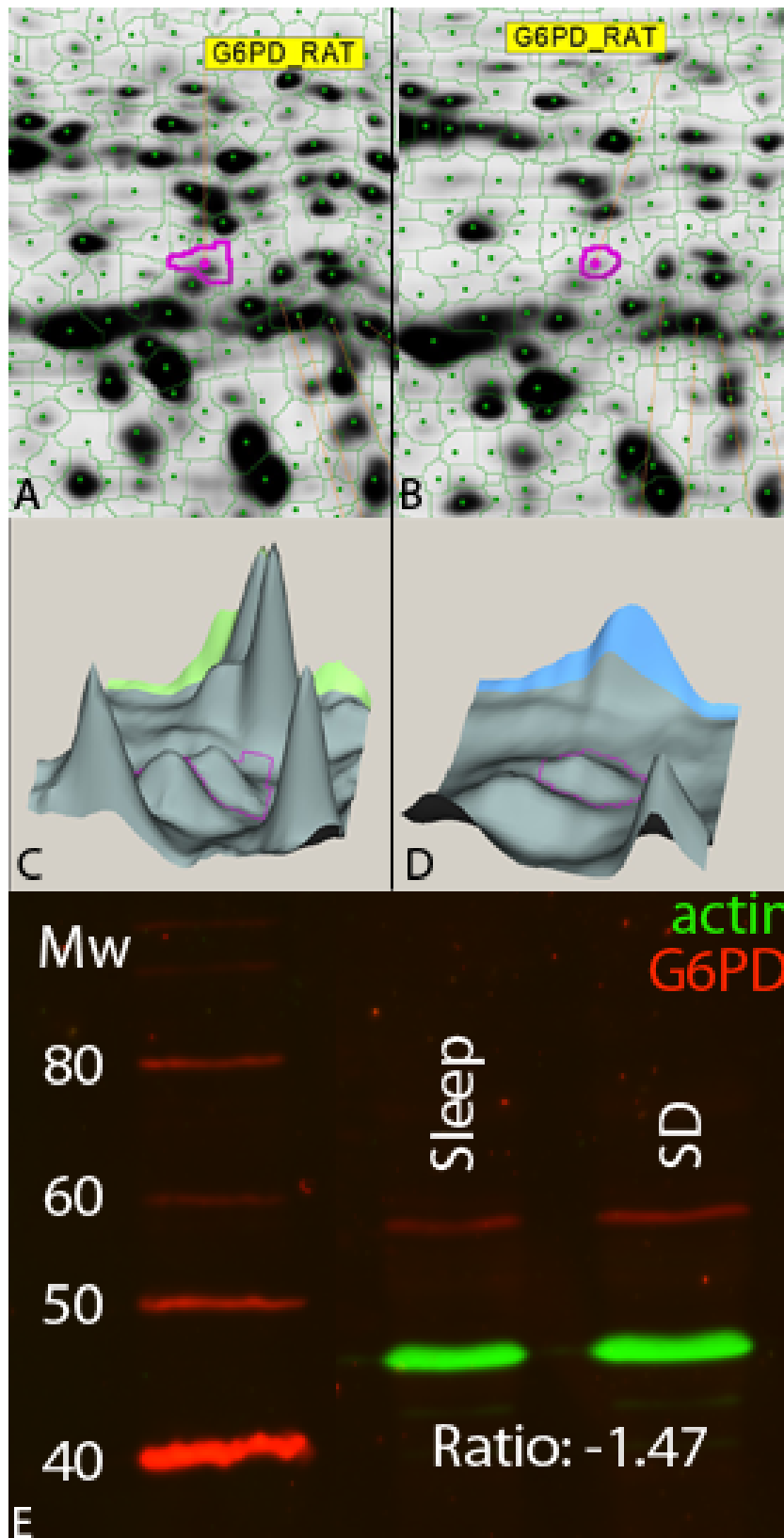


FIG. 26: Régions représentatives de gel 2D (A, B), visualisation 3D (C, D) et western blots (E) pour la Glucose-6-phosphate déshydrogenase. Le rapport moyen issu de l'analyse 2D-DIGE du spot contenant la Glucose-6-phosphate déshydrogenase est de -1.49 ($n = 9$); le rapport moyen du volume de bande issu de l'analyse en western blot est de -1.47 ($n = 3$). Pour tous les western blots, les variations de chargement de l'échantillon révélées par le signal d'actine est pris en compte dans le calcul du rapport moyen de volume de bande.

EFFET D'UN APPRENTISSAGE D'UNE TÂCHE SPATIALE EN DÉBUT DE PÉRIODE D'ACTIVITÉ DIURNE SUR LE PROTÉOME D'HIPPOCAMPE DE RAT

6.1 INTRODUCTION

Parmi les fonctions présumées du sommeil présentées aux chapitres précédents, la possibilité que le sommeil ait un effet sur la plasticité synaptique a reçu une attention particulière depuis quelques années. Cette propriété se réfère à la capacité qu'ont les connexions synaptiques de modifier leur structure et leur fonctionnement en fonction de l'information génétique, des changements environnementaux ainsi que de l'interaction entre ces deux facteurs [92]. Une des hypothèses liant le sommeil à la plasticité synaptique propose que les différents composants du sommeil participeraient à la consolidation des traces mnésiques [108] et à leur traitement subséquent durant lequel les traces peuvent être réactivées, analysées et graduellement incorporées dans la "mémoire à long terme" [168, 190]. En soutien à cette hypothèse, des observations suggèrent que la trace mnésique est initialement labile et devient, plus tard, résistante à sa destruction, ce qui lui permettrait de prendre une forme permanente [166].

Au niveau moléculaire, la plasticité synaptique influence les processus mnésiques et, *in fine*, la mémoire tant à travers des mécanismes intracellulaires contrôlant la force de liaison synaptique qu'à travers des changements de connectivité anatomique.

Parmi les types de mémoires, nous nous intéressons ici à la mémoire dépendante de l'hippocampe. Structurellement, ce type de mémoire requiert le lobe temporal médian du cerveau de mammifère et plus particulièrement l'hippocampe et les régions para-hippocampiques du cortex cérébral. En effet, même si plusieurs types d'apprentissages, spatiaux ou non, simples ou complexes, peuvent être accomplis, tant chez les animaux de laboratoire que chez l'être humain, de manière indépendante de l'hippocampe, celui-ci est la structure principale sous-jacente à une représentation relationnelle des souvenirs ainsi qu'à la flexibilité des relations entre types de mémoires [56]. Cette fonction de l'hippocampe s'applique à de nombreuses situations comme la navigation spatiale ou l'organisation non spatiale de stimuli spécifiques (comme les odeurs) dans des schémas logiques [56].

6.2 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Parmi les différents stades de sommeil observés chez les mammifères, le sommeil paradoxal a reçu une attention particulière dans le cadre de la consolidation mnésique : une augmentation de sommeil paradoxal est observée suivant l'acquisition réussie d'une tâche, une privation de ce stade se traduit par des déficits de mémoire et, finalement, une exposition à divers types de stimulation durant le sommeil paradoxal suivant l'apprentissage améliore la mémorisation de cette acquisition [162]. Dans une série d'expériences, C. Smith et G.M. Rose ont montré l'existence de "fenêtres de sommeil paradoxal", intervalles de temps post-entraînement durant lesquelles la présence de sommeil paradoxal est critique pour la consolidation de la mémoire et sa quantité augmente par rapport aux niveaux "normaux" [159].

Notre objectif sera d'identifier les changements de niveaux d'abondance de protéines dans l'hippocampe de rat après une courte période (4 heures) soit de repos propice au sommeil, soit de privation (ou activation) par manipulation douce suivant l'apprentissage d'une tâche spatiale, le labyrinthe de Morris.

6.3 MATÉRIEL ET MÉTHODE SPÉCIFIQUE

Des rats Sprague-Dawley mâles pesant 170-220g au début de l'expérience (environ 3 mois) sont élevés et acclimatés à l'animalerie comme décrit précédemment (voir chapitres 2 et 5). Tous les rats sont pesés avant et après expérience. Tous les rats sont également acclimatés à nager dans la piscine (sans plate-forme ni indices visuels) la veille de leur entraînement, de manière à différencier l'apprentissage de la stratégie à employer pour réussir le test (i.e. se déplacer dans la piscine pour trouver la plate-forme) de l'apprentissage spatial proprement dit (i.e. localiser cette plate-forme) [11].

Dans un premier groupe ("G1"), les rats ($n = 12$) sont entraînés à la tâche d'apprentissage (labyrinthe de Morris) et privés de sommeil par manipulation douce (voir chapitre 2) durant les 4 heures suivantes. Les animaux sont continuellement observés pendant ce temps. La privation de sommeil est réalisée de la même manière qu'au chapitre 5. Dans un second groupe ("G2"), les rats ($n = 12$) sont également entraînés à la tâche d'apprentissage mais sont laissés non perturbés durant les 4 heures suivantes. Les rats des deux groupes sont testés 24h après l'apprentissage afin d'évaluer la rétention de la tâche.

Dans le second groupe (rats non privés de sommeil), nous avons cherché à déterminer les rats apprenant rapidement ("*fast-learners*") des rats apprenant lentement ("*slow-learners*") la tâche spatiale. Alors que C. Smith utilisait un pourcentage d'apprentissage arbitraire pour déterminer la limite entre ces deux groupes [163] et éliminait les rats

apprenant lentement, nous utiliserons la méthode de Tukey pour identifier les *outliers* (observations paraissant inconsistantes avec le reste des observations suivant une distribution supposée) [158].

Deux groupes de rats Sprague-Dawley mâles âgés d'environ 6 mois au début de l'expérience ont également été constitués ($n = 6$ pour chaque groupe, respectivement "G1b" et "G2b") afin de comparer leurs performances à celles des rats de 3 mois. De cette manière, il nous est possible d'effectuer une comparaison avec l'expérience originale de C. Smith qui utilisait des rats d'environ 6 mois.

La vigilance des rats est surveillée de la même manière qu'au chapitre 5.

Pour l'analyse protéomique, les deux groupes principaux de rats ($n = 6$ pour chaque groupe) sont les mêmes que pour le comportement :

- un premier groupe de rats ("G3") entraînés à la tâche d'apprentissage (labyrinthe de Morris) et privés de sommeil par manipulation douce (voir chapitre 2) durant les 4 heures suivantes ; les rats sont sacrifiés au bout de ces 4 heures ;
- un second groupe de rats ("G4") entraînés à la tâche d'apprentissage et ensuite laissés en repos durant les 4 heures suivantes à la fin desquelles les rats sont sacrifiés.

Afin de pouvoir différencier les différentes composantes des comparaisons entre les deux groupes ci-dessus, trois groupes sont également constitués (rats de 3 mois, $n = 6$ pour chacun d'entre eux) :

- un groupe de rats ("G5") uniquement entraînés à la tâche d'apprentissage et sacrifiés à la fin de celle-ci ;
- un groupe de rats ("G6") uniquement privés de sommeil par manipulation douce pendant 4 heures (et sacrifiés à la fin des 4 heures) ;
- un groupe de rats ("G7") laissés au repos et sacrifiés après 4 heures.

Les différents groupes et ce que les rats appartenant à ces groupes subissent sont résumés à la figure 27.

Le sacrifice de ces rats, la collecte des cerveaux, l'extraction, la séparation et l'identification des protéines ont été réalisés de la même manière qu'au chapitre 5. Notons enfin que les rats de chacun des groupes ont débuté leurs expériences en tout début de phase lumineuse (8h00 du matin dans notre cas).

6.4 RÉSULTATS

6.4.1 *Labyrinthe de Morris*

Les rats ont été entraînés à la tâche du labyrinthe de Morris avec plate-forme submergée pendant 12 tests d'une durée maximale de 2 minutes chacun durant la première journée. Le labyrinthe leur a été présenté de nouveau 24 heures après apprentissage afin de tester à quatre reprises la rétention de la tâche. Deux paramètres sont mesurés :

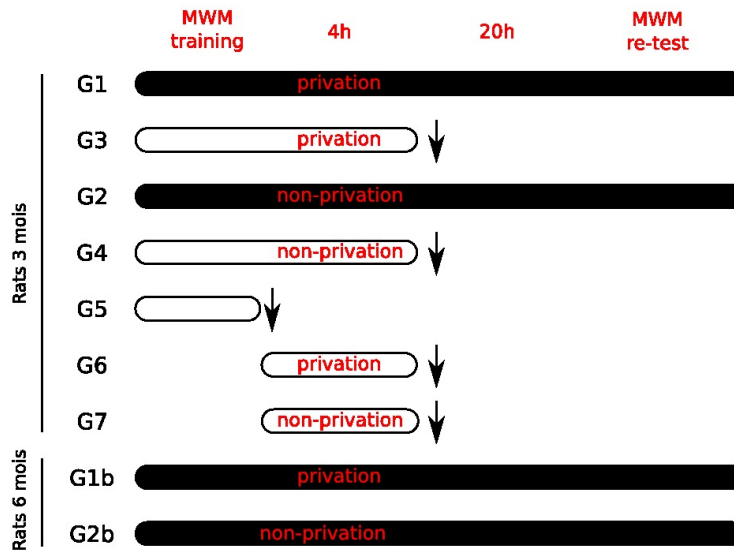


FIG. 27: Schéma des groupes de rats entrant dans l'expérience. Les groupes en gris sont destinés à une analyse comportementale. Les groupes en blanc sont destinés à une analyse protéomique (la flèche montre le moment auquel les rats sont sacrifiés. Détails complémentaires dans le texte.

la latence d'échappement ainsi que la distance totale parcourue avant de trouver la plate-forme. A la fin des quatre tests de rétention, la plate-forme est enlevée et la distance totale parcourue pendant un dernier test de 2 minutes est mesurée. Les performances sont analysées par séries de 4 tests : les tests d'apprentissage 1 à 4 appartiennent à la série 1, les tests 5 - 8 à la série 2, les tests 9 - 12 à la série 3 et les tests de rétention (*probe tests*) 1 - 4, le lendemain, à la série 4 ; la série 5 correspond à l'unique test de rétention sans plateforme.

Nous observons que la latence moyenne d'échappement de tous les rats diminue de manière significative en fonction des répétitions lors de l'apprentissage (*Welsh's one-way analysis of means not assuming equal variance* : $p < 2.2 * 10^{-16}$ (***) ($F = 1788.209$, num df = 4.000, denom df = 93.547) pour toutes les combinaisons de groupe, série, âge) (figures 28 et 29). En particuliers,

1. Pour les rats de 3 mois non-privés de sommeil, on observe (test post-hoc : *Pairwise comparisons using t tests with non-pooled SD*) une différence significative entre la série 1 et les séries 2 ($p = 0.001$), 3 ($p = 7.9 * 10^{-7}$) et 4 ($p = 4.1 * 10^{-5}$) ainsi qu'entre les séries 2 et 3 ($p = 0.01$).
2. Pour les rats de 3 mois privés de sommeil, on observe une différence significative entre la série 1 et les séries 2 ($p = 0.0018$), 3 ($p = 2.6 * 10^{-6}$) et 4 ($p = 7.5 * 10^{-7}$) ainsi qu'entre les séries 2 et 4 ($p = 0.025$).

3. Pour les rats de 6 mois non-privés de sommeil, on observe une différence significative entre la série 1 et les séries 2 ($p = 0.0265$), 3 ($p = 0.0012$) et 4 ($p = 0.0018$).
4. Pour les rats de 6 mois privés de sommeil, on observe une différence significative entre la série 1 et la série 4 ($p = 0.015$).

Cette latence d'échappement reste donc faible lors des tests de rétention, aussi bien pour les rats âgés de 3 mois (figure 28), pour ceux âgés de 6 mois (figure 29), pour les rats privés de sommeil après apprentissage que pour ceux non privés de sommeil. Cela indiquerait que les rats des différents groupes ont bien appris la tâche.

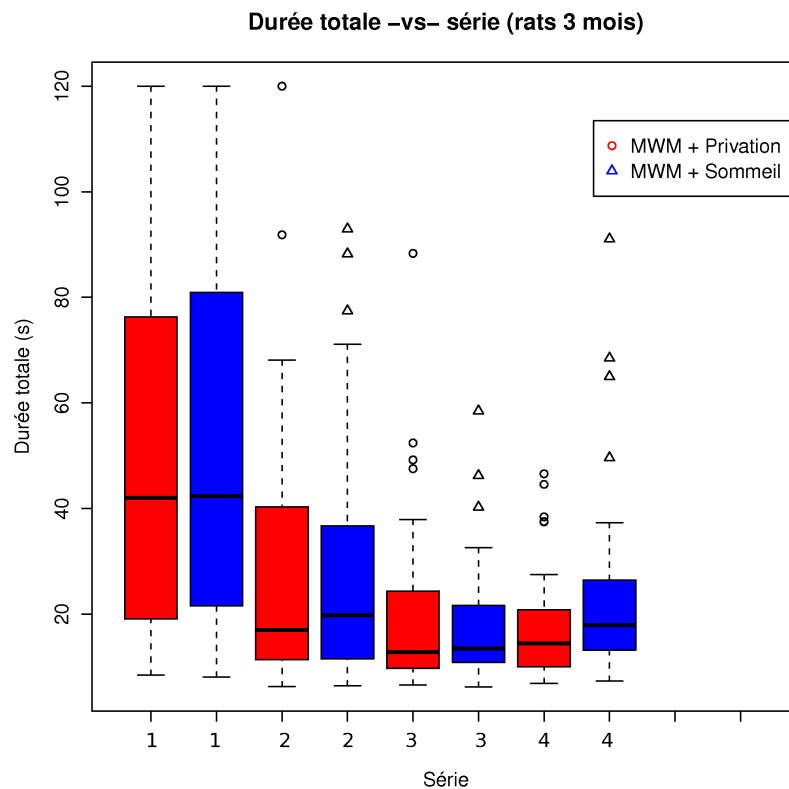


FIG. 28: Latences d'échappement des rats de 3 mois en fonction des séries de tests. Les rats soumis à la privation de sommeil sont représentés en rouge ; les autres rats sont représentés en bleu. Les cercles et les triangles représentent les *outliers* respectivement dans les catégories des rats privés et ceux non-privés de sommeil.

Il en est de même pour la durée totale parcourue dans le labyrinthe, tant pour les rats âgés de 3 mois (figure 30) que pour les rats âgés de 6 mois (figure 31) : la distance total parcourue par tous les rats de diminue de manière significative en fonction des essais lors de l'apprentissage (*Welsh's one-way analysis of means not assuming equal variance* : $p < 9.7 * 10^{-7}$ (***) ($F = 64.3668$, num df = 4.000, denom df = 42.712) pour toutes les combinaisons de groupe, série, âge). En particulier,

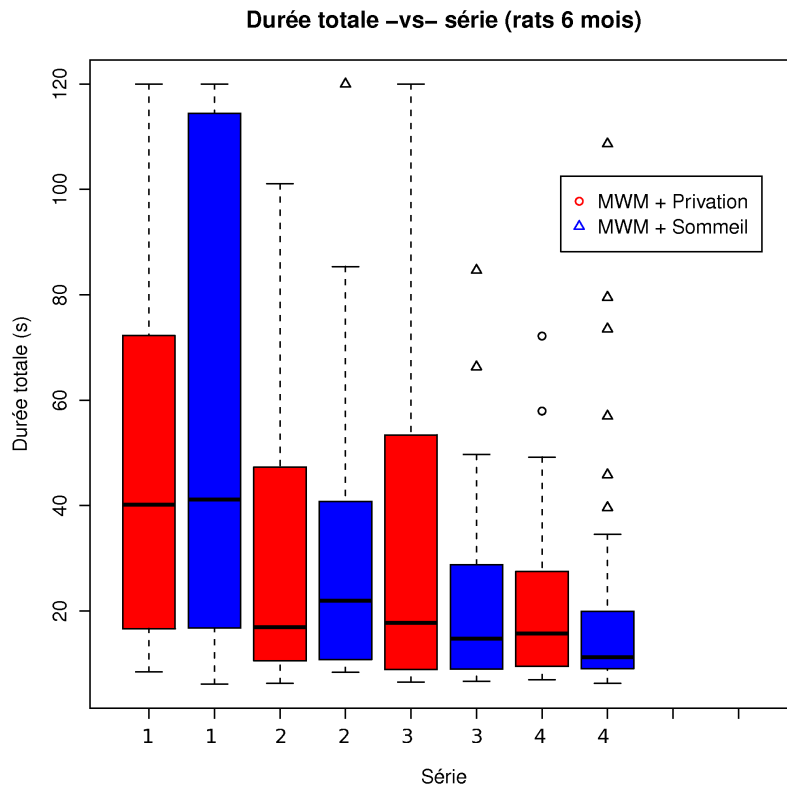


FIG. 29: Latences d'échappement des rats de 6 mois en fonction des séries de tests. Même représentation qu'à la figure précédente.

1. Pour les rats de 3 mois non-privés de sommeil, on observe (test post-hoc : *Pairwise comparisons using t tests with non-pooled SD*) une différence significative entre la série 1 et les séries 2 ($p = 0.00272$), 3 ($p = 2.8 * 10^{-6}$) et 4 ($p = 0.00022$) ainsi qu'entre les séries 2 et 3 ($p = 0.01602$).
2. Pour les rats de 3 mois privés de sommeil, on observe une différence significative entre la série 1 et les séries 2 ($p = 0.0054$), 3 ($p = 9.9 * 10^{-6}$) et 4 ($p = 2.4 * 10^{-6}$) ainsi qu'entre les séries 2 et 4 ($p = 0.0187$).
3. Pour les rats de 6 mois non-privés de sommeil, on observe une différence significative entre la série 1 et les séries 2 ($p = 0.0393$), 3 ($p = 0.0023$) et 4 ($p = 0.009$).
4. Pour les rats de 6 mois privés de sommeil, on observe une différence significative entre la série 1 et la série 4 ($p < 0.002$).

Dans chacune des figures ci-dessus, aucun des *outliers* ne sont communs à plus de 2 séries.

Dans l'unique test de rétention sans plateforme, les rats (privés ou non de sommeil) ont passé statistiquement plus de temps et nagé une distance plus grande dans le quadrant qui contenait la plateforme par rapport aux autres quadrants (données non montrées).

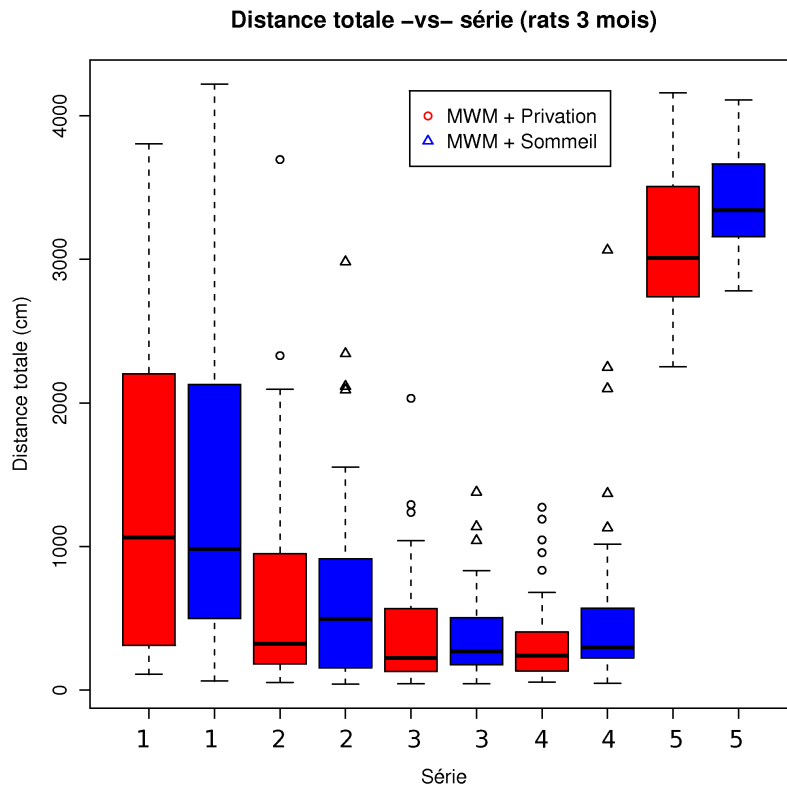


FIG. 30: Distances totales parcourues dans le labyrinthe par des rats de 3 mois en fonction des séries de tests. Même représentation qu'à la figure précédente.

6.4.2 *Privation de sommeil*

Le comportement des rats a été observé durant les 4 heures suivant l'apprentissage. Tant les rats destinés initialement à être privés de sommeil par une activation douce que les rats en repos n'ont pas dormi durant les 4 heures d'observation. Cela signifie que nous n'avons pas de rat en "sommeil" dans aucune condition, mais uniquement des rats en activation douce ou en repos. Dans la suite de ce chapitre, nous emploierons donc les termes plus adéquats d'"activation douce" et de "repos" à la place de, respectivement, "privation de sommeil" et "sommeil".

6.4.3 *Indices de stress*

Les rats destinés à la protéomique ont été sacrifiés immédiatement après les 4 heures de repos ou d'activation douce. Le cerveau entier, l'hippocampe, l'estomac et les glandes surrénales ont été enlevés, pesés et stockés à -80°C . L'estomac a été ouvert et, après son observation minutieuse, nous n'avons pas pu trouver d'ulcération. Le poids des glandes surrénales a été comparé entre les rats activés doucement

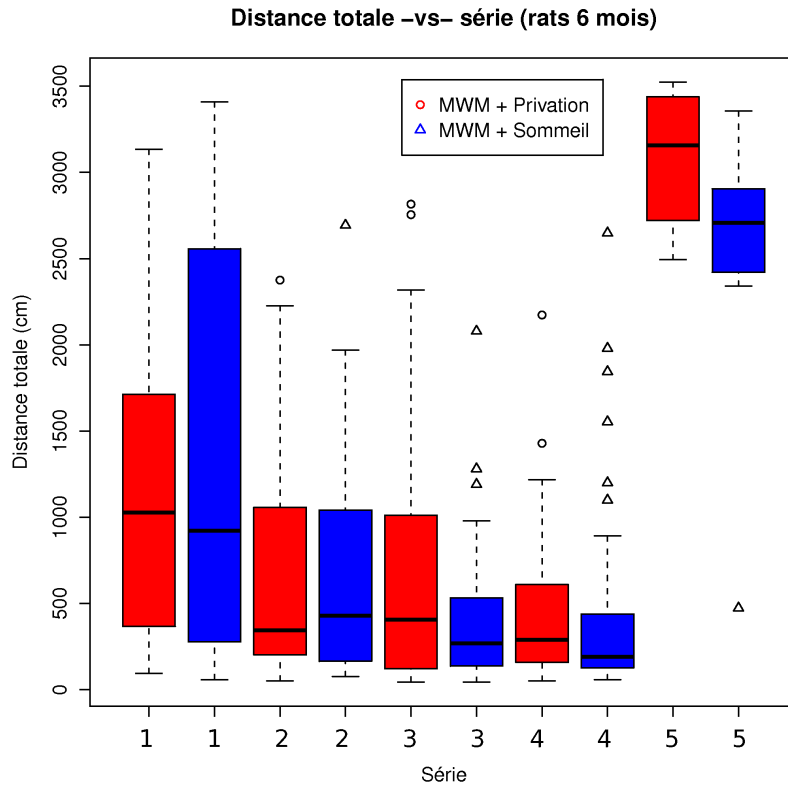


FIG. 31: Distances totales parcourues dans le labyrinthe par des rats de 6 mois en fonction des séries de tests. Même représentation qu'à la figure précédente.

et les rats en repos et aucune différence significative n'a été trouvée (test de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Le poids des rats n'a pas changé significativement non plus entre les deux groupes (test de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

6.4.4 Etude comparative du profil protéomique des hippocampes par 2D-DIGE et identification des protéines

Pour chacun des rats, les protéines d'hippocampe ont été extraites, dosées, marquées soit avec du CyDye Cy3 ou Cy5 et séparées par électro-focalisation entre les pH 4 et 7 (première dimension). Après réduction et alkylation, les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse en SDS-PAGE.

Après digitalisation des images des gels, les distributions bi-dimensionnelles des protéines d'hippocampe ont été analysées. Le marquage des protéines aux CyDyes combiné à une détection automatisée des spots permet la visualisation d'environ 4000 spots individuels sur un gel 2D.

Les différentes sections ci-dessous montrent les résultats des comparaisons entre les conditions suivantes :

1. apprentissage suivi d'une activation douce -vs- apprentissage suivi de repos,
2. repos seul -vs- apprentissage suivi de repos,
3. activation douce seule -vs- apprentissage suivi d'une activation douce,
4. apprentissage seul -vs- apprentissage suivi de repos.

Les comparaisons suivantes n'ont pas été effectuées car elles n'apportent pas d'éclairage nouveau sur les systèmes étudiés :

1. activation douce seule -vs- apprentissage suivi de repos,
2. repos seul -vs- apprentissage suivi d'activation douce.

Comparaison entre apprentissage suivi d'activation et apprentissage suivi de repos

Le profil des protéines hippocampiques de rats privés de sommeil après apprentissage (n = 6) est très similaire à celui de rats en repos après apprentissage (n = 6). Cependant, après appariement des spots dans les 6 paires d'images, 139 spots ont montré une variation significative entre les conditions sommeil et privation de sommeil : 75 spots sont régulés positivement d'un facteur supérieur à 1.2 suite à la privation de sommeil alors que 64 spots sont régulés négativement d'un facteur supérieur à 1.2.

Au spectromètre de masse MALDI-TOF, nous avons identifié de manière non ambiguë 18 protéines par PMF. Leurs noms, numéros d'accèsion, changements d'abondance relative et d'autres données de spectrométrie sont résumés dans le tableau 10.

Comparaison entre repos seul et apprentissage suivi de repos

Nous avons ensuite examiné l'effet de l'exposition des rats à un apprentissage suivi de 4 heures de repos (n = 6) par rapport à des rats ayant été laissés en repos durant 4 heures (n = 6). Tout comme pour l'expérience précédente, les profils protéomiques sont très similaires. 161 spots montrent une variation significative d'abondance relative après 4 heures de repos seul, comparées à un repos de 4 heures après apprentissage : 63 spots sont plus abondants (d'un facteur supérieur à 1.20) dans la condition de repos seul alors que 98 spots sont moins abondants (d'un facteur supérieur à 1.20).

Des 60 spots sélectionnés envoyés au spectromètre de masse MALDI-TOF, nous avons identifié de manière non ambiguë une protéine par PMF : la dihydropyrimidinase-related protein 2 (**DPYL2_RAT**), plus exprimée en condition "repos seul" (rapport moyen d'abondance de 1.33 avec p-value de 0.0170). Son point isoélectrique identifié est de 5.95 et son poids moléculaire identifié est de 62.638kDa. Son score de Mowse est de 93.

#	ID	Nom	Fonction	Rapport de volume	p (<i>t-test</i>)	pI	Mw	Score de Mowse
927	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein	S	1.81	0.0180	5.37	71055	177
1463	TBB1_RAT	Tubulin β -2B chain	Y	1.73	0.0130	4.94	50788	245
1811	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	Y	1.62	0.0220	5.29	42052	196
1683	ENOG_RAT	γ -enolase	M	1.56	0.0028	5.03	47379	213
2131	IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	M	1.53	0.0059	6.47	40044	90
1186	GRP75_RAT	Stress-70 protein, mitochondrial	S	1.5	0.0280	5.07	74083	68
1350	TBB5_RAT	Tubulin β -5 chain	Y	1.47	0.0120	4.78	50095	101
1539	ENOA_RAT	α -enolase	M	1.46	0.0029	6.16	47309	196
1296	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	D	1.38	0.0170	5.95	62638	100
1488	ATPB_RAT	ATP synthase subunit β , mitochondrial	M	1.36	0.0470	5.19	56318	266
1338	TBA1A_RAT	Tubulin α -1A chain	Y	1.36	0.0130	4.94	50788	47
1258	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	C, S, T	1.34	0.0110	5.91	62638	56
1727	NSFL1C_RAT	NSFL1 cofactor p47	M	1.33	0.0230	5.04	40655	104
1551	ARP3_MOUSE	Actin-related protein 3	Y	1.25	0.0220	5.61	47652	96
1344	VIME_RAT	Vimentin	Y	1.25	0.0250	4.94	50788	128
865	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein	T	1.23	0.0280	5.07	72473	271
1150	AINX_MOUSE	α -internexin	Y	1.21	0.0350	5.2	56253	52
1535	TS101_RAT	Tumor susceptibility gene 101 protein	T	-1.49	0.0096	6.28	44281	48

Tab. 10: Protéines d'hippocampe dont l'abondance diffère entre les conditions "apprentissage + repos" et "apprentissage + activation douce". Dans la colonne "Fonction", A = régulation de la transcription, C = traduction, repliement et dégradation des protéines, D = développement, G = signalisation cellulaire, M = métabolisme cellulaire et énergétique, S = stress, chaperon, T = transport et trafic vésiculaire, Y = cytosquelette. Dans la colonne "Rapport moyen d'abondance", un nombre positif correspond à une protéine plus abondante après que le rat ait appris le labyrinthe de Morris (MWM) suivi de 4 heures d'activation douce par rapport à un apprentissage du labyrinthe de Morris suivi de 4 heures de repos. Le rapport moyen représente le rapport entre les abondances moyennes de la protéine dans les différentes conditions, tel que calculé par le logiciel DeCyder. Autres abréviations : pI = point isoélectrique identifié ; Mw = poids moléculaire identifié. Le score de Mowse est défini par Pappin et al. [124].

Comparaison entre activation douce seule et apprentissage suivi d'activation douce

Nous avons ensuite examiné l'effet de l'exposition des rats à un apprentissage suivi de 4 heures d'activation ($n = 6$) par rapport à des rats ayant été privés de sommeil sans apprentissage préalable ($n = 6$). Les profils protéomiques sont également très similaires. 142 spots montrent une variation significative d'abondance relative entre les deux conditions : 61 spots sont plus abondants (d'un facteur supérieur à 1.20) dans la condition d'apprentissage suivie d'activation alors que 81 spots sont moins abondants (d'un facteur supérieur à 1.20).

Des 75 spots sélectionnés envoyés au spectromètre de masse MALDI-TOF, nous avons identifié de manière non ambiguë 2 protéines par PMF. Leurs noms, numéros d'accension, changements d'abondance relative et d'autres données de spectrométrie sont résumés dans le tableau 11.

Comparaison entre apprentissage seul et apprentissage suivi de repos

Nous avons finalement examiné l'effet de l'exposition des rats à un apprentissage suivi de 4 heures de repos ($n = 6$) par rapport à des rats ayant juste appris la tâche ($n = 6$). Les profils protéomiques sont également très similaires. 200 spots montrent une variation significative d'abondance relative entre les deux conditions : 94 spots sont plus abondants (d'un facteur supérieur à 1.20) dans la condition d'apprentissage suivi de repos alors que 106 spots sont moins abondants (d'un facteur supérieur à 1.20).

Des 82 spots sélectionnés envoyés au spectromètre de masse MALDI-TOF, nous avons identifié de manière non ambiguë 5 protéines par PMF. Leurs noms, numéros d'accension, changements d'abondance relative et d'autres données de spectrométrie sont résumés dans le tableau 12.

6.5 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons cherché à différencier le comportement de rats ainsi que l'abondance relative de protéines dans l'hippocampe de ces rats selon que ces derniers ont consolidé - ou non - une tâche mnésique spatiale. Nous avons pu observer que tant les différences comportementales que d'abondance relative de protéines sont minimales voire inexistantes. Les différents aspects de cette expérience sont discutés ci-dessous.

6.5.1 *Activation douce avec et privation de sommeil*

C. Smith et G.M. Rose ont montré que le temps passé en sommeil paradoxal durant les 4 heures suivant l'apprentissage augmente après une série d'apprentissage du labyrinthe de Morris et qu'une privation

#	ID	Nom	Fonction	Rapport de volume	p (<i>t-test</i>)	pI	Mw	Score de Mowse
865	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein	T	1.2	0.0440	5.07	72473	271
1263	TBB1_RAT	Tubulin β chain	Y	-1.53	0.0490	4.79	50387	186

TAB. 11: Protéines d'hippocampe dont l'abondance diffère entre les conditions "Apprentissage + activation douce" et "Activation douce seule". Dans la colonne "Fonction", A = régulation de la transcription, C = traduction, repliement et dégradation des protéines, D = développement, G = signalisation cellulaire, M = métabolisme cellulaire et énergétique, S = stress, chaperon, T = transport et trafic vésiculaire, Y = cytosquelette. Dans la colonne "Rapport moyen d'abondance", un nombre positif correspond à une protéine plus abondante après que le rat ait appris le labyrinthe de Morris (MWM) suivi de 4 heures d'activation douce par rapport à une activation douce seule. Le rapport moyen représente le rapport entre les abondances moyennes de la protéines dans les différentes conditions, tel que calculé par le logiciel DeCyder. Autres abréviations : pI = point isoélectrique identifié ; Mw = poids moléculaire identifié (en Da). Le score de Mowse est défini par Pappin et al. [124].

#	ID	Nom	Fonction	Rapport de volume	p (<i>t-test</i>)	pI	Mw	Score de Mowse
1683	ENOG_RAT	γ -enolase	M	1.42	0.0078	5.03	47379	213
1539	ENOA_RAT	α -enolase	M	1.37	0.0046	6.16	47309	196
1186	GRP75_RAT	Stress-70 protein	S	1.34	0.0420	5.07	74083	68
1338	TBA1A_RAT	Tubulin α -1A chain	Y	1.35	0.0180	4.94	50788	47
1258	CH60_RAT	60kDa heat shock protein	S	1.33	0.0190	5.91	62638	56

TAB. 12: Protéines d'hippocampe dont l'abondance diffère entre les conditions "Apprentissage seul" et "Apprentissage + repos". Dans la colonne "Fonction", A = régulation de la transcription, C = traduction, repliement et dégradation des protéines, D = développement, G = signalisation cellulaire, M = métabolisme cellulaire et énergétique, S = stress, chaperon, T = transport et trafic vésiculaire, Y = cytosquelette. Dans la colonne "Rapport moyen d'abondance", un nombre positif correspond à une protéine plus abondante après que le rat ait juste appris le labyrinthe de Morris (MWM) par rapport à un apprentissage suivi de 4 heures de repos. Le rapport moyen représente le rapport entre les abondances moyennes de la protéines dans les différentes conditions, tel que calculé par le logiciel DeCyder. Autres abréviations : pI = point isoélectrique identifié ; Mw = poids moléculaire identifié (en Da). Le score de Mowse est défini par Pappin et al. [124].

spécifique de sommeil paradoxal durant cette période de 4 heures perturbait l'encodage de cette mémorisation spatiale [162]. Cependant, dans notre protocole expérimental très proche de celui de Smith et Rose, nous n'avons pas pu observer de phase de sommeil durant les 4 heures d'observation suivant le labyrinthe de Morris. Nous n'avons donc aucun rat en "sommeil" dans aucune condition, mais uniquement des rats manipulés (privés de sommeil) ou en repos (non privés de sommeil).

Parmi les quelques différences entre les protocoles des deux études, nous pouvons exclure un effet de l'âge des animaux puisque nous avons vérifié que des rats de 6 mois (de même âge que ceux de Smith et Rose) ne montrent pas non plus de signe de sommeil durant les 4 heures qui suivent l'apprentissage.

Le fait que nous commençons nos expériences à 8h00 et non à 10h00 [162] pourrait être la cause de la différence de comportement chez les rats de Smith et Rose et les nôtres. En effet, en commençant l'expérience à 10h00, les rats de Smith et Rose ont déjà pu dormir pendant 3 heures (début de leur phase lumineuse à 7h00). En réveillant les rats pour l'expérience, Smith et Rose favoriseraient le retour des animaux à cet état de sommeil, du moins en ce qui concerne ceux qui sont autorisés à dormir ensuite. À l'inverse, nos rats commençant l'expérience à l'heure où la phase lumineuse débute, l'apprentissage et la privation (ou non-privation) de sommeil procéderait d'une courte extension de leur période active.

Cependant, à 8h00, nos rats sont au maximum de leur courbe du processus homéostatique [21]. Ils devraient donc être plus enclins à dormir que les rats de Smith et Rose qui, ayant dormi déjà 3 heures, ont pu diminuer cette pression de sommeil.

6.5.2 *Labyrinthe de Morris*

Au niveau comportemental, tous les rats semblent avoir appris la tâche, peu importe le groupe dans lequel ils se trouvent et peu importe les paramètres étudiés. L'apprentissage est même très rapide puisque la différence entre la première série de tests et la seconde est déjà statistiquement significative pour les deux groupes d'âge, pour les deux paramètres étudiés ainsi que pour la présence ou non de sommeil (nous reviendrons plus tard sur ce dernier point). La seule exception réside dans le groupe des rats de 6 mois privés de sommeil où seule la différence entre les séries 1 et 4 est statistiquement significative. Dans ce groupe, si l'apprentissage se fait plus lentement (performances statistiquement non différentes entre les séries 1 à 4), cela serait plutôt dû au hasard qu'à la méthode de privation de sommeil, cette dernière n'ayant pas encore eu lieu lors des différentes séries d'apprentissage.

Ainsi, contrairement aux rats de Smith et Rose, tous nos rats semblent avoir appris la tâche, le jour même, et retenu cette tâche, le lendemain. D'une certaine manière, cette divergence entre les résultats pourrait provenir d'un effet modulateur de l'horloge biologique sur la performance dans le labyrinthe de Morris comme l'indique Valentinuzzi et ses collègues [177]. Selon cette étude, les animaux testés dans leur phase active (apparentés à nos rats) montreraient des courbes d'acquisition plus raide que les rats testés dans leur phase inactive (apparentés aux rats de Smith et Rose) non pas parce qu'ils ont une meilleure acquisition et maintenance de l'information spatiale mais parce qu'ils auraient un meilleur motif de recherche. Nos rats involontairement soumis à une extension de leur période active compenseraient la privation de sommeil par un meilleur motif de recherche, leur permettant ainsi d'acquiescer et retenir la tâche.

Si nous revenons à l'expérience de Smith et Rose, un certain nombre de paramètres différent de notre expérience et pourraient jouer un rôle dans les différences de résultats obtenues. Ces paramètres sont résumés à la table 13.

L'âge des rats ne semble pas jouer un rôle : nous avons montré que les rats de 6 mois ont des performances semblables à ceux de 3 mois. Le nombre différent d'animaux par groupe ne devrait pas jouer un rôle prépondérant dans les différences d'observations finales, bien que Smith et Rose emploient un test paramétrique pour un échantillon aussi petit. Les paramètres de mise en phase avec la période lumineuse pourraient jouer un rôle dont il a été question à la section précédente. Les autres paramètres ne semblent pas avoir une influence prépondérante sur les observations divergentes [51], à l'exception des paramètres suivants :

1. forme de la piscine : les études de Smith et Rose sont les seules à mettre en oeuvre une piscine rectangulaire pour le labyrinthe de Morris or de nombreux autres chercheurs m'ont confirmé que les rats avaient tendance à rester "bloqués" dans les angles. Ceci pourrait expliquer nos différences si les rats privés de sommeil de Smith et Rose se réfugiaient dans les angles lors des tests de rétention non pas parce qu'ils n'ont pas retenu la tâche mais simplement parce qu'ils sont plus fatigués. Cette hypothèse n'expliquerait cependant pas pourquoi les rats de Smith et Rose effectuent de bons tests de rétention s'ils ont été privés de sommeil à d'autres moments que les 4 heures de sommeil suivant l'apprentissage sauf si cette période initiale est importante pour la récupération physique. Notons finalement que la différence de taille de la surface d'eau libre ne semble pas importante [180].
2. observation : le fait que les autres rats puisse observer ce qui se passe dans le labyrinthe avant ou après apprentissage pourrait également jouer un rôle

Critères	Smith et Rose, 1997 [162]	Notre expérience
Âge des rats	6 à 7 mois	3 à 4 mois
Nombre d'animaux par groupe	8	12
Lumières allumées	de 7h à 19h (? lux)	de 8h à 20h (133 lux)
Début de l'expérience	10h du matin	8h du matin
Forme de la piscine	rectangulaire	circulaire
Surface de nage	105*80cm (0.84m ²)	180cm de diamètre (2.54m ²)
Plate-forme	8.5cm de diamètre, à 2cm sous l'eau	20cm de diamètre, à 4cm sous l'eau
Durée des 12 tests	1h15min	1h
Couleur de l'eau	blanche	noire
Température de l'eau	23 à 24°C	24 à 25°C
Manipulation préalable	pendant 5 jours, 10min par jour	pendant 14 jours, 10min par jour
Repos entre série de tests	10min	5min
Les autres rats	peuvent voir l'expérience en cours	ne peuvent pas voir l'expérience en cours
Méthode de privation de sommeil	pot de fleur (PSD)	manuelle (TSD)
Mesures	manuelles	automatiques
Indices visuels extérieurs sur les 4 côtés de la pièce	cages, lampe, expérimentateur et rien	carré rouge de 110cm de côté, cercle bleu de 110cm de diamètre, poster publicitaire Ao et rien (embrasure de porte)

TAB. 13: Comparaison de différents paramètres entre nos expériences et celle de Smith et Rose

3. privation de sommeil : notre privation de sommeil est beaucoup moins stressante que la technique du pot de fleur utilisée par Smith et Rose. Il se peut que, dans les travaux de Smith et Rose, ce soit cette crainte très intense de tomber dans l'eau durant le sommeil qui ait empêché les rats de consolider la tâche et non la perturbation liée à la simple absence de sommeil. Il est à noter qu'au niveau comportemental les rats que nous avons privés de sommeil via la technique dite "du pot de fleur inversé" lors d'essais initiaux nous ont semblé beaucoup plus agités et stressés que les rats privés de sommeil par manipulation douce (résultats non montrés). D'autre part, il se peut que la manipulation douce ait été perçue par les rats comme une récompense, une partie de jeux comme celles auxquelles ils ont été habitués durant les 2 semaines précédant l'apprentissage. La manipulation douce ne serait plus dès lors une privation de sommeil mais plutôt une méthode d'enrichissement de l'environnement.
4. indices visuels : comme il n'existe aucun critère spécifique quant au choix, au type ni à la taille des indices visuels [51], les nôtres seraient peut-être supranormaux et, de ce fait, ne seraient pas oubliés spontanément.

Parmi les rats non privés de sommeil, nous avons également cherché à distinguer les rats apprenant rapidement (*fast-learners*) des rats apprenant lentement (*slow-learners*). Parce qu'aucun des rats ne se différencie vraiment des autres dans nos expériences, il a été impossible d'appliquer les mêmes critères de sélection que Smith [163] ou Schuls [153]. La définition d'*outliers* que nous avons appliquée nous a semblé la plus objective possible ; mais même avec cela, aucun des outliers représentés dans les figures 6.1 à 6.4 n'est présent dans plus de 2 séries de tests (ce qui nous aurait permis de les classer en plus d'une catégorie selon leurs performances et ainsi de ne pas prendre en compte un seul groupe potentiellement hétérogène).

6.5.3 Protéomique

Malgré l'absence de différence importante au niveau comportemental, nous avons pu identifier un certain nombre de différences au niveau protéomique. Il nous semble important de souligner dès le début que ces résultats sont seulement partiels (environ 10% des protéines envoyées en spectrométrie de masse ont été identifiées) et requièrent une confirmation ultérieure par une seconde technique de protéomique (comme les western blots du chapitre 5). Dans chacune des comparaisons, un nombre sensiblement équivalent de spots voient leur abondance relative être supérieure dans une condition et pas l'autre. Ceci indiquerait que des changements de même ampleur se produiraient dans l'un et l'autre sens de chacune des comparaisons.

Globalement, nous remarquons également qu'aucune comparaison ne présente de protéines exprimées de manière différentielle impliquées dans la régulation de la transcription ni la signalisation cellulaire. A l'inverse, les protéines du cytosquelette sont présentes dans chaque comparaison, sans qu'on puisse trouver un point commun entre les conditions dans lesquelles ces protéines sont exprimées plus abondamment.

Comparaison entre apprentissage suivi de privation et apprentissage suivi de repos

Bien que les analyses ont montré pratiquement autant de protéines dont l'abondance relative augmentait dans la condition d'apprentissage suivi de privation de sommeil (75 protéines) que dans la condition d'apprentissage suivi de repos (64 protéines), les protéines identifiées appartiennent en plus grand nombre à la condition d'apprentissage suivi de privation de sommeil.

Dans l'hippocampe des rats activés par manipulation douce après apprentissage, les protéines montrant une plus grande abondance participent à quatre fonctions principales : le métabolisme cellulaire, les voies biochimiques de l'énergie, celles du transport et du trafic vésiculaire, le cytosquelette et le stress. Avant d'entamer une discussion sur ces protéines et ces fonctions, la protéine appartenant à une cinquième fonction va être passée en revue.

La dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYL2, rapport de 1.38) est impliquée dans la différenciation neuronale et le guidage des axones [138]. Elle est exprimée abondamment dans le cerveau en développement et son expression persiste à l'âge adulte. Veyrac et ses collègues suggèrent que cette protéine est toujours associée avec la neurogenèse dans le cerveau adulte [183]. Elle promeut la formation de microtubules en se liant aux hétérodimères de tubuline [68]. Étant substrat de la Rho kinase, lorsque cette dernière la phosphoryle, cela inhibe sa capacité de se lier aux dimères de tubuline ainsi qu'aux microtubules et, de ce fait, inactive sa capacité de promouvoir l'assemblage des microtubules [7]. Sa plus grande expression chez les rats privés de sommeil après apprentissage serait donc liée à la plus grande expression des autres protéines liées au cytosquelette discutées ci-dessous.

Les protéines liées au cytosquelette sont les plus importantes en nombre parmi les protéines identifiées dans cette expérience. On y retrouve trois types de tubulines (la tubuline α -1A de rapport 1.36, la tubuline β -2B de rapport 1.73 et la tubuline β -5 de rapport 1.47), l'actine cytoplasmique 1 (rapport de 1.62), l'actin-related protein 3 (rapport de 1.25), la vimentine (rapport de 1.25) et l' α -internexine (rapport de 1.21).

L' α -internexine (un composant des filaments intermédiaires) est un marqueur des tissus neuronaux et une protéine critique pour le développement neuronal [59]. Ainsi, cette augmentation d'abondance dans

l'hippocampe de rat après apprentissage et privation de sommeil indiquerait la présence de modifications morphologiques des neurones afin de s'adapter à une possible potentialisation synaptique [174]. Tant son importance pour l'axone et la vitesse de conduction nerveuse que sa corrélation avec les niveaux de transporteurs de glutamate dans le cerveau compromis au niveau énergétique [199] donnent à l' α -internexine un rôle potentiel dans l'homéostasie de l'énergie. D'autres études ont également montré qu'elle était régulée positivement après un exercice volontaire [54] de la même manière que l'augmentation de l'expression des gènes liés à la LTP durant l'exploration intensive [86], deux phénomènes liés à l'apprentissage du labyrinthe de Morris. Globalement, cette plus grande abondance d' α -internexine semble en accord avec l'hypothèse d'homéostasie synaptique [174]. Ici, comme la durée de l'épisode d'activation par manipulation douce est probablement trop courte pour provoquer une prolifération neuronale, le changement d'abondance de l' α -internexine pourrait simplement être dû à des modifications post-traductionnelles liées à la plasticité synaptique et à un effort physique plus important dû à l'activation couplée à l'apprentissage de la tâche spatiale.

Pour les trois formes de tubuline, les deux d'actine ainsi que la vimentine (rapport de 1.25), leur plus grande abondance relative sous-tendrait le renforcement synaptique ainsi que l'augmentation du nombre et de la stabilité des épines dendritiques observés lors de l'établissement d'une potentialisation à long terme [56].

Toutes les fonctions attribuées aux protéines dont l'abondance augmente après la privation de sommeil requièrent de l'énergie. C'est dans ce sens que nous observons une augmentation du rapport d'abondance de protéines liées au métabolisme cellulaire et énergétique : les énolases α et γ (rapports de respectivement 1.46 et 1.56), l'isocitrate déshydrogénase (rapport de 1.53), le NSFL1 cofacteur p47 (rapport de 1.33) et la sous-unité β de l'ATP synthase (rapport de 1.36). Une augmentation de l'expression de gènes liés au métabolisme énergétique dans des conditions de privation de sommeil a déjà été montrée dans la littérature [36]. Nos résultats suggèrent une adaptation rapide des neurones et/ou des cellules gliales à une augmentation de la demande métabolique liée à l'éveil par rapport au sommeil. Ils sont également en accord avec l'hypothèse d'une augmentation de la demande d'énergie éventuellement liée à une augmentation progressive de la force synaptique lors de l'éveil prolongé [174].

Contrairement à la comparaison du chapitre 5 (sommeil -vs- privation de sommeil), certaines protéines liées à la réponse de stress ont été identifiées dans l'hippocampe. La plupart des protéines identifiées ici sont issues de gènes de réponse cellulaire au stress régulés positivement après 3 à 8 heures d'éveil spontané [33] comme la GRP75 (rapport de 1.5), la GRP78 (rapport de 1.23), la HSP7C (rapport de 1.81) et la CH60 (rapport de 1.34). Par exemple, la protéine GRP78 est exprimée de

manière constitutive dans le réticulum endoplasmique où elle assiste au repliement des glycoprotéines et polypeptides nouvellement synthétisés. Une ischémie ou un choc de chaleur sont classiquement impliqués dans l'augmentation des niveaux d'ARN messenger et/ou de protéines de GRP78 afin de dégrader les protéines non repliées accumulées en grande quantité dans ces conditions ou de les replier correctement. Tout comme pour l'augmentation observée de la quantité d'ARN messenger de GRP78 dans le cas d'une privation de sommeil de 8 heures [35], l'augmentation de l'abondance relative de la protéine GRP78 dans notre cas serait la conséquence d'un plus grand nombre de protéines à replier. Cette augmentation du nombre de protéines traduites ne serait pas due ici à un stress comme l'hypoxie ou la privation de glucose mais à la plasticité synaptique [44].

Dans l'autre sens de comparaison, une seule protéine identifiée a son abondance relative supérieure en condition d'apprentissage suivi de non-privation, la tumor susceptibility gene 101 protein (rapport de -1.49). Cette protéine est impliquée principalement dans divers cancers mais aussi dans l'ubiquitination, la régulation de la transcription, le trafic endosomal et la prolifération cellulaire [187]. Comme elle agit comme un régulateur négatif de croissance, son abondance relative plus importante dans cette condition pourrait simplement être due au fait que son abondance ait diminué après apprentissage et privation de sommeil, ce qui concourrait à l'abondance relative plus importante des protéines liées au cytosquelette après apprentissage et privation de sommeil.

Comparaison entre repos seul et apprentissage suivi de repos

De manière générale, on peut observer que l'insertion d'une séance d'apprentissage d'une tâche spatiale avant le repos engendre une légère augmentation de l'abondance des protéines hippocampiques (par rapport au repos seul).

Dans cette comparaison, seule une seule protéine a été identifiée, la dihydropyrimidinase-related protein 2 (rapport de 1.33). Cette protéine a une abondance relative plus importante en condition de non-privation de sommeil par rapport à un apprentissage suivi d'une non-privation de sommeil. Sa capacité de promouvoir l'assemblage des microtubules [7] serait augmentée en repos seul ou diminuée dans un apprentissage suivi d'une période de repos.

Comparaison entre activation douce seule et apprentissage suivi d'activation douce

De manière générale, on peut observer que l'insertion d'une séance d'apprentissage d'une tâche spatiale avant activation douce engendre une légère diminution de l'abondance des protéines hippocampiques (par rapport à l'activation douce seule).

La seule protéine identifiée dont l'abondance relative est plus grande après apprentissage et activation douce est la GRP78, liée à la réponse au stress (rapport de 1.2). Comme discuté plus haut, le gène codant pour cette protéine se retrouve également dans la réponse cellulaire au stress de 3 à 8 heures d'éveil spontané [33]. De nouveau, l'augmentation de protéines liées à la plasticité synaptique [44] entraînerait un plus grand nombre de protéines à replier qui, à son tour, entraînerait l'augmentation de l'abondance relative de la GRP78.

La seule protéine identifiée dont l'abondance relative est plus grande après activation douce seule est la chaîne β de la tubuline (rapport de -1.53). Soit il s'agirait d'un artefact, soit l'activation douce induirait également une certaine forme de potentialisation à long terme et, ainsi, une augmentation du nombre et de la stabilité des épines dendritiques [56].

Comparaison entre apprentissage seul et apprentissage suivi de repos

Dans cette comparaison, on peut observer que l'insertion d'une séance d'apprentissage avant repos diminue légèrement l'abondance relative des protéines hippocampiques (par rapport à l'apprentissage seul). Toutes les protéines identifiées ici possèdent une abondance relative plus grande dans la condition d'apprentissage seule.

Les α - et la γ -énolases (rapports respectifs de 1.37 et 1.42) sont impliquées dans le métabolisme cellulaire et énergétique et, plus particulièrement, dans la glycolyse. L'énergie produite pourrait avoir été utilisée pour alimenter la machinerie liée à l'apprentissage.

Nous retrouvons également deux protéines de stress, la GRP75 et la CH60 (rapports respectifs de 1.34 et 1.33). Même si un maximum de précautions ont été prises, nous ne pouvons pas exclure un certain niveau de stress lors de l'apprentissage.

Finalement, la chaîne α -1A de la tubuline possède également un rapport d'abondance plus élevé en condition d'apprentissage seule. Elle aiderait ainsi l'augmentation du nombre et de la stabilité des épines dendritiques pour soutenir la potentialisation à long terme [56].

6.6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Par la combinaison d'une approche comportementale et protéomique, cette étude a démontré qu'une "activation douce" de courte durée suivant l'apprentissage d'une tâche spatiale affecte différents réseaux de protéines, principalement liés au métabolisme cellulaire et au cytosquelette dans l'hippocampe de rat, une région du cerveau jouant un rôle central dans la cognition.

Nous ne pouvons pas extrapoler ces résultats à ceux de Smith et Rose car nous n'avons pas pu obtenir de sommeil chez les rats non-privés comme dans leurs expériences. Cependant, si nous nous limitons à une comparaison entre des rats ayant subi une activation forcée

de courte durée et des rats au repos, nous observons déjà quelques changements d'abondance relative de protéines s'inscrivant dans la perception actuelle des relations entre sommeil et mémoire. On peut noter ici la sensibilité de la technique de protéomique employée ici, technique qui nous a permis de déceler de petites différences de variations d'abondance alors que peu de différences sont apparues au niveau comportemental.

Les remarques émises en conclusion du chapitre 5 sont également de mise ici :

1. notre approche comparative a détecté non seulement les protéines produites ou dégradées après diverses conditions mais elle a sans doute également détecté les protéines sujettes à des modifications post-traductionnelles menant à une modification du point iso-électrique et/ou de la masse moléculaire de leur sous-unités constitutives.
2. nous ne nous sommes occupés que de la partie acide du protéome. Nous n'avons dès lors pas pu observer de différences d'abondance d'autres protéines comme la protéine EGR1 (early growth response) dont le point iso-électrique est alcalin et résulte de la traduction d'un gène bien connu dont l'expression est liée à l'expérience [147].

Finalement, ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes. Tout d'abord, au niveau technique, les protéines identifiées devraient être confirmées par une seconde technique de protéomique comme des western blots. Mais nous devrions pouvoir également identifier plus de protéines parmi celles montrant des différences d'abondance relative entre les différentes conditions. L'ensemble des protéines identifiées représenterait mieux alors l'ensemble des variations observées lors des analyses de protéomique.

De manière plus générale, il serait intéressant d'obtenir une véritable privation de sommeil après l'apprentissage du labyrinthe de Morris. Cela nous permettrait de comparer de manière plus adéquate nos résultats à ceux de Smith et Rose. Mais cela permettrait également d'observer les modifications d'abondance relative pour des protéines que nous avons probablement déjà identifiées dans ce chapitre mais également d'autres protéines éventuellement liées aux gènes exprimés très tôt lors de la privation de sommeil [36]. Un dernier point intéressant serait d'analyser les variations d'abondance relative après différentes durées de privation de sommeil.

Deuxième partie

APPENDICES



PUBLICATIONS

A.1 PREMIÈRE PUBLICATION

Research

Open Access

Gemvid, an open source, modular, automated activity recording system for rats using digital video

Jean-Etienne Poirrier*^{†1,2}, Laurent Poirrier^{†3}, Pierre Leprince² and Pierre Maquet¹

Address: ¹Cyclotron Research Center, University of Liege, Allee du 6 Aout, 8 (B30), 4000 Liege, Belgium, ²Centre for Cellular and Molecular Neurobiology, University of Liege, Avenue de l'Hôpital, 1 (B36), 4000 Liege, Belgium and ³Applied Sciences Faculty, University of Liege, Chemin des Chevreuils, 1 (B52), 4000 Liege, Belgium

Email: Jean-Etienne Poirrier* - jepoirrier@ulg.ac.be; Laurent Poirrier - laurent@poirrier.be; Pierre Leprince - pleprince@ulg.ac.be; Pierre Maquet - pmaquet@ulg.ac.be

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 25 August 2006

Received: 14 July 2006

Journal of Circadian Rhythms 2006, **4**:10 doi:10.1186/1740-3391-4-10

Accepted: 25 August 2006

This article is available from: <http://www.jcircadianrhythms.com/content/4/1/10>

© 2006 Poirrier et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Measurement of locomotor activity is a valuable tool for analysing factors influencing behaviour and for investigating brain function. Several methods have been described in the literature for measuring the amount of animal movement but most are flawed or expensive. Here, we describe an open source, modular, low-cost, user-friendly, highly sensitive, non-invasive system that records all the movements of a rat in its cage.

Methods: Our activity monitoring system quantifies overall free movements of rodents without any markers, using a commercially available CCTV and a newly designed motion detection software developed on a GNU/Linux-operating computer. The operating principle is that the amount of overall movement of an object can be expressed by the difference in total area occupied by the object in two consecutive picture frames. The application is based on software modules that allow the system to be used in a high-throughput workflow. Documentation, example files, source code and binary files can be freely downloaded from the project website at <http://bioinformatics.org/gemvid/>.

Results: In a series of experiments with objects of pre-defined oscillation frequencies and movements, we documented the sensitivity, reproducibility and stability of our system. We also compared data obtained with our system and data obtained with an Actiwatch device. Finally, to validate the system, results obtained from the automated observation of 6 rats during 7 days in a regular light cycle are presented and are accompanied by a stability test. The validity of this system is further demonstrated through the observation of 2 rats in constant dark conditions that displayed the expected free running of their circadian rhythm.

Conclusion: The present study describes a system that relies on video frame differences to automatically quantify overall free movements of a rodent without any markers. It allows the monitoring of rats in their own environment for an extended period of time. By using a low-cost, open source hardware/software solution, laboratories can greatly simplify their data acquisition and analysis pipelines and improve their workload.

Background

Measurement of locomotor activity is a valuable tool for analysing factors influencing behaviour and for investigating brain function. As a result, assessment of locomotor activity has been used in many fields such as neurotoxicology, psychopharmacology, biological rhythm research, etc.

In the past, the most widely used automated devices for measuring locomotor activity have been stabilimeters [1], microwaves [2], photocell-based systems [3] and running wheels [4]. The latter technology has gradually come to dominate the area, probably because of its reasonable cost and adaptability to varying environmental configurations. But these methods in general either present flaws or are of very high cost. For example, counting interruptions of infrared light beams in a cage using photocell sensor units mainly reflects locomotion instead of overall movements and has poor temporal resolution. The reconstruction of multi-dimensional movements from markers tracked by motion analysis systems is not suitable for measuring overall movements (because markers are placed on the entire body and these markers prevent free animal behaviour) and is costly. Running-wheel systems fail to record activity when the animal is not on the wheel and may induce changes in circadian period [5,6]. Finally, a simple, visual observation of behaviour and manual counting of movements is subjective and prone to inter-examiner differences.

Newer technologies have become available that provide the opportunity to detect motor activity, primarily locomotion, in a different and potentially more accurate way. Some of these are contrast-sensitive or frame-difference video tracking systems [7-9]. In addition to the use of the frame-difference technique, the system we present here takes advantage of two other technological evolutions: increasing computer power, allowing the use of inexpensive technologies that were previously costly (e.g. IR-camera that can record even in the dark) and open source software, widely and openly available to anyone for use and modification.

We designed our system based on four ideal, basic requirements [10]:

- Data collection should not influence the rhythmic physiological variables.
- Acquired data should permit flexible and powerful analysis.
- Data should be collected regularly during each oscillatory period (increasing frequency spectrum) and for many successive cycles (increasing frequency resolution).

- Data collection should be automated.

Methods

Our system consists of a closed-circuit television (CCTV) camera that non-invasively records all movements of a rat in its own cage. It then uses custom-designed motion detection software running on a GNU/Linux-based personal computer. The operating principle is that the amount of overall two-dimensional movement of an animal can be expressed by the difference in total area occupied by the object in two consecutive picture frames (two-dimensional object-difference method [7]), during light and dark periods.

The video image analysing system consists of 3 components (Figure 1): a visible/infrared CCTV camera, a computer equipped with a common TV tuner and modular software pieces.

For the first component, we used a small, low-cost CCTV camera (LYD-806C CCD, Lianyida, China), capable of working at 0 lux and mounted on a standard tripod. This construction allowed the adjustment of the height of the camera and the adjustment of the angle and distance between the camera and the animal cage. The camera was set in such a way that the longest side of the rat cage was perpendicular to the camera view. In this configuration, we could measure more animal movements. In the light phase, light was provided by three 133 cm, 36 W neon tubes placed on the ceiling. They produced a perceived intensity of 260lux in the cage (LX-6610 luxmeter, Elix). During the dark phase, 30 infrared LEDs inside the camera were automatically switched on.

Conventional equipment was used for the last hardware component: an Intel Pentium II personal computer running RedHat Linux v.7. This computer uses a video card with a TV tuner/frame grabber (Rage 128 Pro, ATI, USA).

Images from the camera were transmitted to the computer and digitised by the frame-grabber. Our system digitises 25 frames per second (25 Hz). Frame resolution is 360 by 240 pixels (86400 pixels in total). Pixel size is 0.133 cm at 1 m.

Any other camera/frame grabber system can be used, provided it is recognized by the Video4Linux library <http://linuxtv.org/v4lwiki/>. This allows the use of commercial webcams, regular (IR-unable) camera and CCTV.

The computer programs were designed with modularity in mind. Each module can be used separately. Moreover, results from each module are openly described and can be used by any other custom process, software or analyser. A clear advantage is that, by launching the same module in

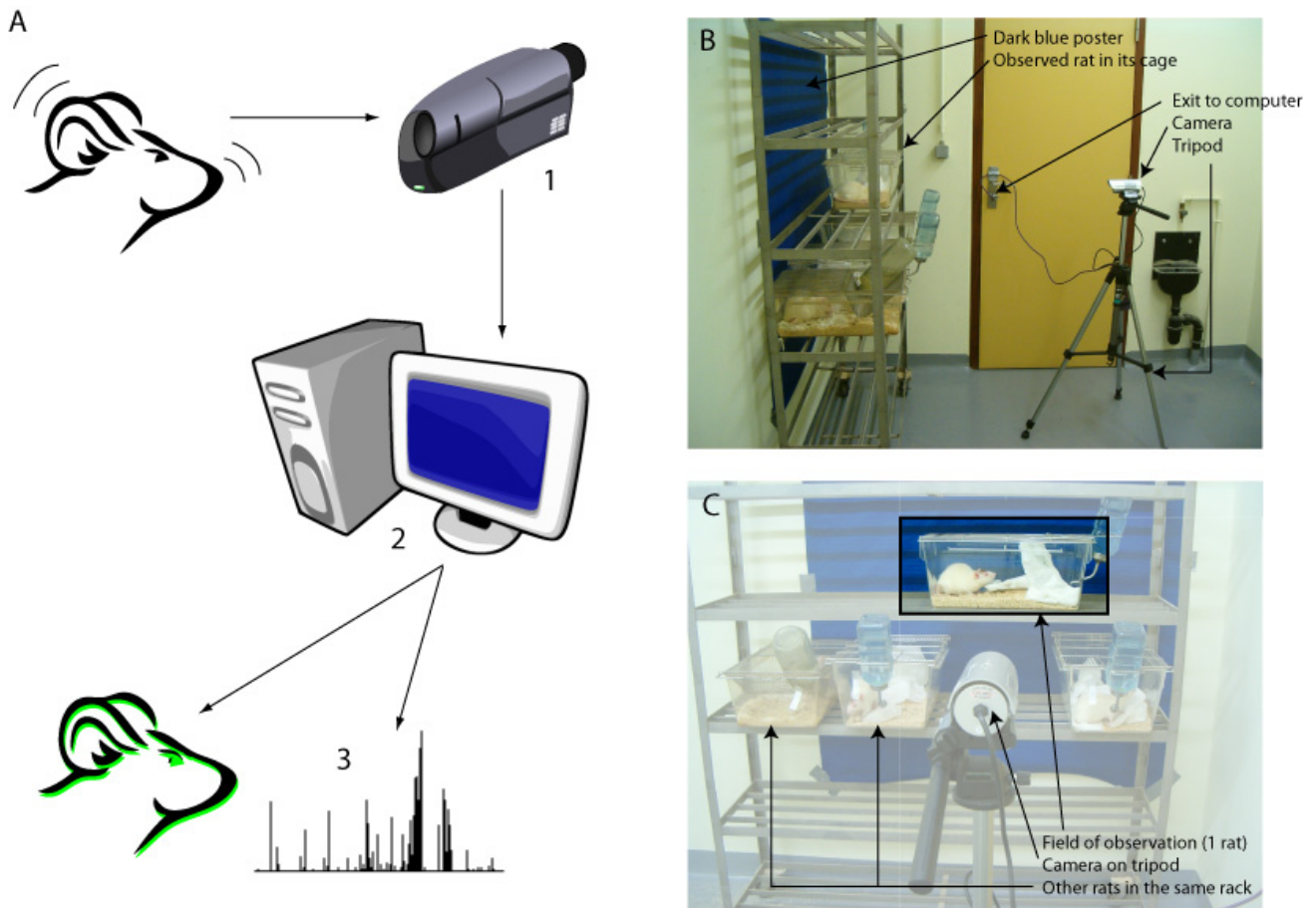


Figure 1
The three components of the video image analysis system. A: schematic representation; B and C: picture of the setup in our laboratory.

different processes, our system can easily be extended to simultaneously monitor several animals. Software are written in C and licensed under the GNU General Public Licence. Documentation, example files, source code and binary files can be freely downloaded from the project website at <http://bioinformatics.org/gemvid/>.

Our first software module acquires frames and compares each frame with the previous one. The number of pixels that change between two frames is associated with the time during which the frame was taken (when activity occurred: in hour, minute, second and millisecond). Our system processes 25 frame comparisons per second (25 Hz, as fast as frames arrive).

The software first shows the observation field in real time and overlays a layer that highlights the changed pixels in green. Thus, a first use of this software allows visualization of behavioural changes that occur in real time.

A signal can be sent to the operator or back to the rat environment if the amount of movement is below a user-defined threshold (number of pixels) for a user-defined duration. This signal can be, for instance, visual (on a computer screen) and/or auditory (through computer loudspeakers).

Numerical results from the first module are sent to the standard output: every 25th fraction of a second, a string containing the time and the number of pixels changed, compared to the previous frame, is sent to the command line. The number of modified pixels is an indirect measure of rat overall activity. This output allows the quantification of changes that occur in real time.

Via a pipe or a redirection, data output from the first module can be stored in a text file. The data output can be easily modified to store values in other formats. The length of a continuous data acquisition period is limited only by the memory size of the computer hard disk (a day of

acquisition is contained in a 80 Mb text file; 6 Mb when compressed with gzip).

Data can later be processed by a second software module. The current module draws actograms, indicating the relative intensity of the overall movement of the rat (y-axis) at a given time (x-axis). Other analyses can be performed by any mathematical or statistical software package.

Two other parameters can be set: a minimum and/or maximum count value. The minimum count value sets the minimum number of changed pixels that are scored as movement. In this experiment, we set the lower limit filter value at 100 pixels, corresponding approximately to a square of 2 cm² in our experimental setup.

In experiment 1, we investigated the sensitivity and reproducibility of our device and software to detect the exact frequency of movement of a small object with regular movement. We placed a metronome (Taktell Piccolino, Wittner, Germany) at a distance of 1 meter from the camera and we recorded several series of oscillations at different frequencies (40, 52, 100, 152 and 200 oscillations per minute). Each recording lasted 60 seconds. We applied a short-time Fourier transform (in Matlab R2006a, Mathworks, USA) to recorded signals in order to extract observed frequencies. We also performed a Pearson's product-moment correlation test between theoretical and observed frequencies (R 2.3.1, R Foundation for Statistical Computing, Austria [11]).

In experiment 2, we left the metronome (at 52 oscillations per minute) in front of the system during 10 hours. Since the metronome signal is stable in time, we tested the detection stability of our system. We also applied a short-time Fourier transform to compare spectrograms obtained at the beginning and at the end of the test. This procedure allowed us to detect any potential drift of signal detection in time, leading to false increase or decrease in movement.

In experiment 3, we were interested in the sensitivity of our system and in the comparison of our data with another well-established activity-monitoring device. On a custom-designed mobile going at two different speeds (23.81 cm · s⁻¹ and 45.45 cm · s⁻¹), we placed an Actiwatch Plus (Cambridge Neurotechnology Ltd, United Kingdom) and a white square paper of variable surface. This paper was placed perpendicularly in front of the camera. We recorded a series of movements of the mobile at different speeds and with different surface areas (80, 128, 160, 192, 224 and 256 cm²). This area range was chosen because it encompassed the area occupied by the projection of a rat seen laterally on a vertical surface (approximately 150 cm²). We reported data obtained from our system and from the Actiwatch on the same chart. A Pear-

son's product-moment correlation test was also applied to recorded signals with different moving areas.

Experiments 4 to 6 were performed on 8 male Sprague-Dawley rats weighing 200–250 g at the time of observation. Upon their arrival, the rats were housed in group cages and had food and water ad libitum. Seven days prior to observation, rats were individually housed in smaller cages (18 cm high × 29 cm wide × 20 cm deep), food and water still ad libitum. The room was maintained at a temperature of 22–24 °C and a relative humidity of 30–40%. All procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Liège.

In order to maintain a certain level of animal welfare during data acquisition, we left the rat in its own cage, at the same place in the cage rack, with a little bit of nesting material. Nothing was placed inside the rat environment. A dark blue poster was left hanging on the wall behind the rat cage. This provided a sufficient contrast with white rats when viewed in visible light.

On the day before the first day of observation, the camera was placed approximately at 2 m from the back wall of the cage. The observation frame contained the whole cage. Apart from the animal, all other objects remained inert in the observation field.

In experiment 4, we investigated the sensitivity of our device with real animals and the types of movement that it effectively detected. Data acquisition was started simultaneously with the time-stamped video-cassette recording of the rat (AG-VP320, Panasonic, Japan). Later on, the video-cassette was played back and we compared the amount of pixels that had changed with the observed behaviour.

In experiment 5 (6 rats), a 12 h light-dark cycle was imposed with the lights automatically turned on at 06:00 h and off at 18:00 h (LD 12:12). The rats were left undisturbed for the next 7 days with food and water ad libitum, except on day 3, when litter was changed and food and water were provided when necessary. Data were automatically and continuously collected for the whole experimental period, except when we changed the litter. Subsequently, data analysis was performed off-line. Our data analysis included the data presentation with the second software module (creation of actogram) and a test of stability over time. This test was also performed in order to verify that there was no drift in the detection system. For that purpose, we calculated the mean number of pixels that changed each hour. The means between the days and conditions (light or dark) were compared using an ANOVA in R.

Experiment 6 (2 rats) was carried out with two rats in the same conditions as in experiment 5 except that the rats were kept in constant darkness (DD, 0 lux) since the first day of observation. Data presentation was performed with the second software module.

Results

In the first experiment, the system was able to collect enough samples to find the right oscillation frequencies of the metronome. Figure 2 (A, B, C) shows the result of the spectral analysis for one frequency (200 oscillations per minute, or 3.333 Hz). In Figure 2 (D), we plot the observed frequencies versus theoretical frequencies (set up on the metronome from 0.66 to 3.3 Hz). Pearson's correlation coefficient is 0.9992245 ($p < 10^{-16}$), indicating that the observed frequencies are not statistically different from the theoretical ones.

In Figure 3, we show two spectrograms derived from observed oscillations of the metronome (at 52 oscillations per minute, or 8.86667 Hz) at the beginning and end of a 10-hour continuous experiment. The comparison of the two spectrograms shows that there is no drift of detected signal after 10 hours: the main frequency coefficient of variation during the first quartile is 0.32701% and this coefficient of variation during the last quartile is 0.57637%.

The comparison of data collected with our system and data from the Actiwatch show that they are quite similar. However, our system detected activity before the Actiwatch (example of two movements of our mobile in Figure 4A). Three factors made this comparison difficult. First, the Actiwatch resolution is low as its shortest period is 2 s while our system's shortest period is 0.04 s. Second, observed movements in this type of setup are in the lower range of sensitivity for the Actiwatch. Finally, the Actiwatch can only detect variation in speed of movement ("activity") while our system also detects variations in the amount of movement (number of changed pixels, see next paragraph). In the same third experiment, we compared the number of pixels that changed using different moving areas. In Figure 4B, we plot the mean number of pixels changed versus different areas. Pearson's correlation coefficient is 0.9511966 ($p < 10^{-7}$), indicating that the size of a body that moves (at the same speed) is related to the number of pixels that change.

In the fourth experiment, the amount of pixels that changed during the data acquisition was compared with the rat behaviour. We observed that the system was very sensitive, even to very small movements of the head or the tail (Figure 5A, left). When rats were sleeping, no movement was detected (Figure 5A, right).

The recordings of 7 days of activity of 6 different rats in the second experiment were similar to those presented in Figure 5B, top. Actograms are plots of the number of pixels changed (y-axis) versus time during the day (x-axis). Figure 5B, bottom left, shows an interesting activity pattern: for unknown reasons, rat 3 recurrently increased its activity around noon (other rats did not show the same activity pattern; nothing in the environment could explain this specific behaviour).

In Figure 5C, we plot the mean number of changed pixels each day for one rat. The ANOVA test indicates that there is a significant difference between the two conditions, as expected ($p < 0.001$) but that there is no significant day effect nor difference in the interaction between day and condition ($p < 0.05$). All this indicates that there is no drift in the detection system over time.

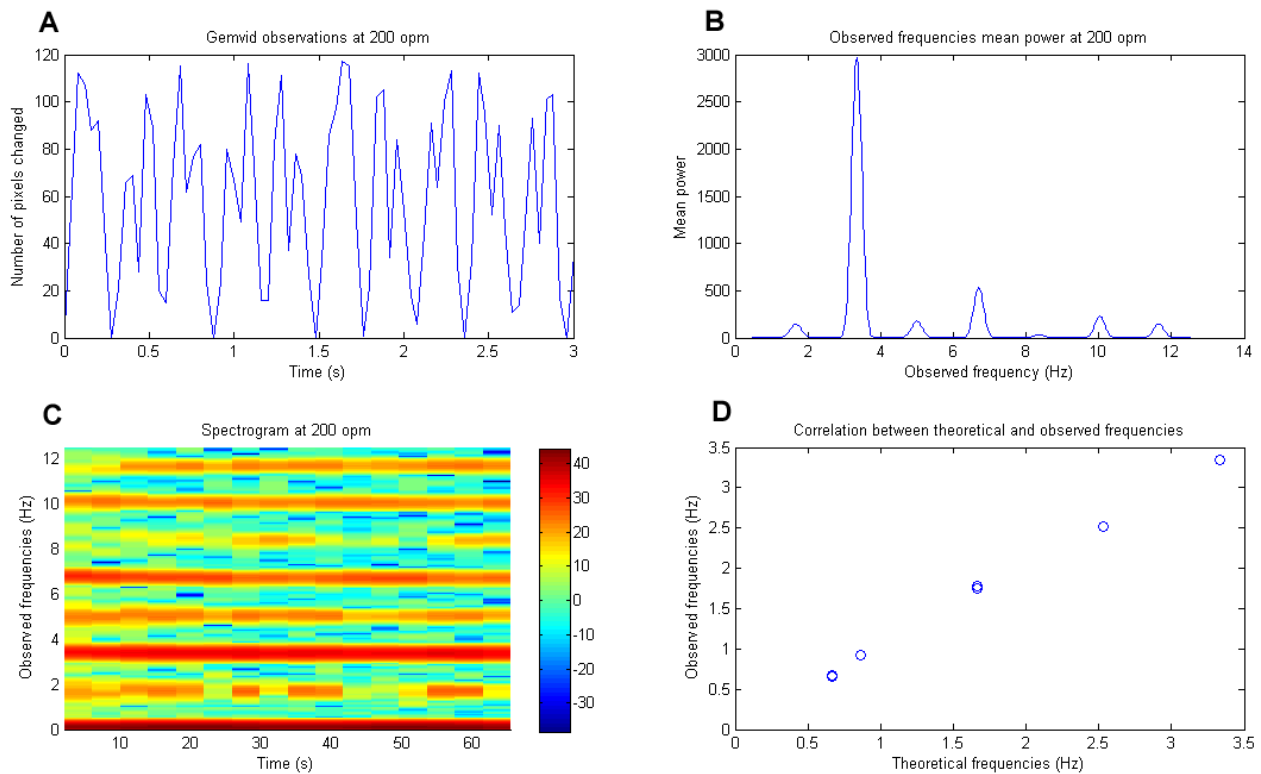
Finally, Figure 6 compares the activity of the same rat between a regular day in LD conditions and the fifth day in DD conditions. In LD conditions, the rat drastically reduced its activity at 6:24 (24 minutes after lights were switched on) but became very active just after the light were switched off (at 18:00). Four days after being put in DD conditions, it drastically reduced its activity at 10:02 (4 hours after the initial drop in activity) but became very active only at 19:44 (nearly two hours after lights were switched off in the previous configuration).

Conclusion

The present study describes a system that relies on frame difference video technology. The main operating principle is that the amount of overall movement of an object can be expressed by the total area of the object which changes from frame to frame. We demonstrate that the system we designed is sensitive enough and stable in its acquisition process.

To test the validity of this system, we first tested it with a metronome, giving a regular and stable movement. We show that the system is sensitive enough to detect the small movements of the metronome at 1 m of distance and that the observed data contains the oscillation frequency. We demonstrate that there is no drift in the detection process since observed data contain the same oscillation frequencies for at least 10 hours. Moreover, we show that, while recording a real animal, the mean number of pixels that changed each day was also not significantly different.

We have compared our system with an Actiwatch device and, despite some limiting factors inherent to the Actiwatch, both systems recorded activity at approximately the same time. Moreover, we also showed that, with our system, there was a strong correlation between the mean

**Figure 2**

Observation and spectral analysis of a metronome at 200 oscillations per minute. A: observations from the first software module. B: mean power of observed frequencies; 3.35 Hz is the frequency that has the maximum mean power (200 opm = 3.333 Hz). C: spectrogram of observed frequencies over time (intensity scale on the right) (opm = oscillations per minute). D: correlation plot between theoretical and observed frequencies of a metronome (n = 24)

number of pixels changed and the size of the areas moving at the same speed.

To test this system with animals, rats were observed in LD and DD conditions. The results of experiment 4 show that there is usually more activity during the dark periods than the light periods, as expected for a nocturnal animal. Our system was also able to detect changes in the length of the endogenous circadian period. Indeed, *Rattus norvegicus* has a period of more than 24 h that becomes apparent in free-running conditions (constant darkness here).

We overcame the limitation of video recording during darkness by using a camera that, by automatically switching to infrared in complete darkness, allowed us to continuously monitor activity during the light and dark phases.

There are, however, three disadvantageous features of this technique:

- The recording of movements parallel to the camera viewpoint axis (vertical movements when the camera is above the cage) cannot be recorded by a single camera. Certain movements within the region of the object cannot be detected, such as movements in the direction of the camera (it is for this reason that we placed the longest side of the cage in front of the camera).
- Part of the bedding that are actively displaced by the rodent during foraging sometimes lead to miscalculation of the overall movement. This issue might be solved by including a segmentation step before the frame subtraction.
- Finally, one should note that our system can record activity from only one animal at a time. This limitation can be overcome by including a segmentation step or, for a small number of animals, by launching as many processes as different animals/cameras in the experiment.

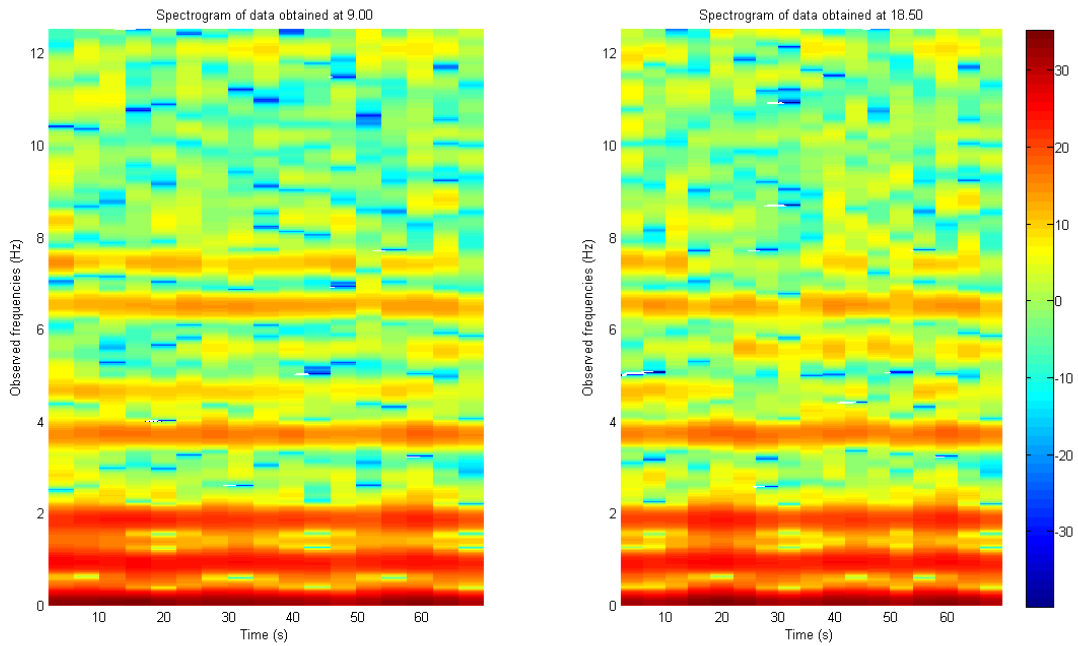


Figure 3
Spectral analysis of two periods of data acquisition with a metronome set up at 52 oscillations per minutes = 0.8667 Hz, in a continuous experiment. Left: spectrogram from data acquired at 9:00 hr. Right: spectrogram from data acquired at 18:50 hr.

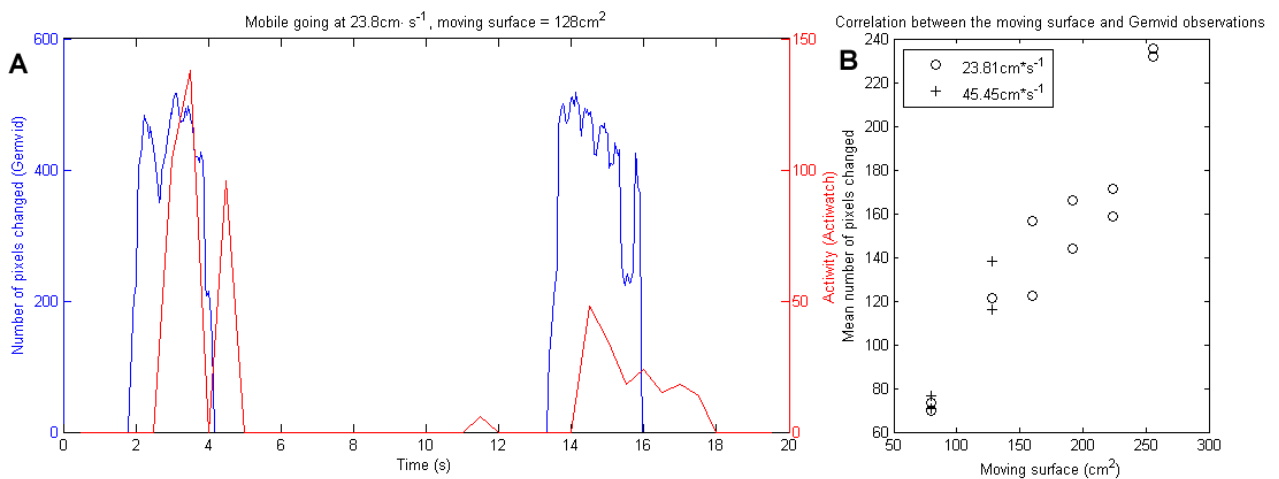


Figure 4
Comparison of data from Gemvid and from Actiwatch. A: observed data from each device is presented in blue for Gemvid and red for Actiwatch. Mobile is going at $23.8 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and the mobile surface is 128 cm^2 . B: correlation plot between the size of the moving surface and the mean number of pixels that changed for each value of area ($n = 3$ for each value of area).

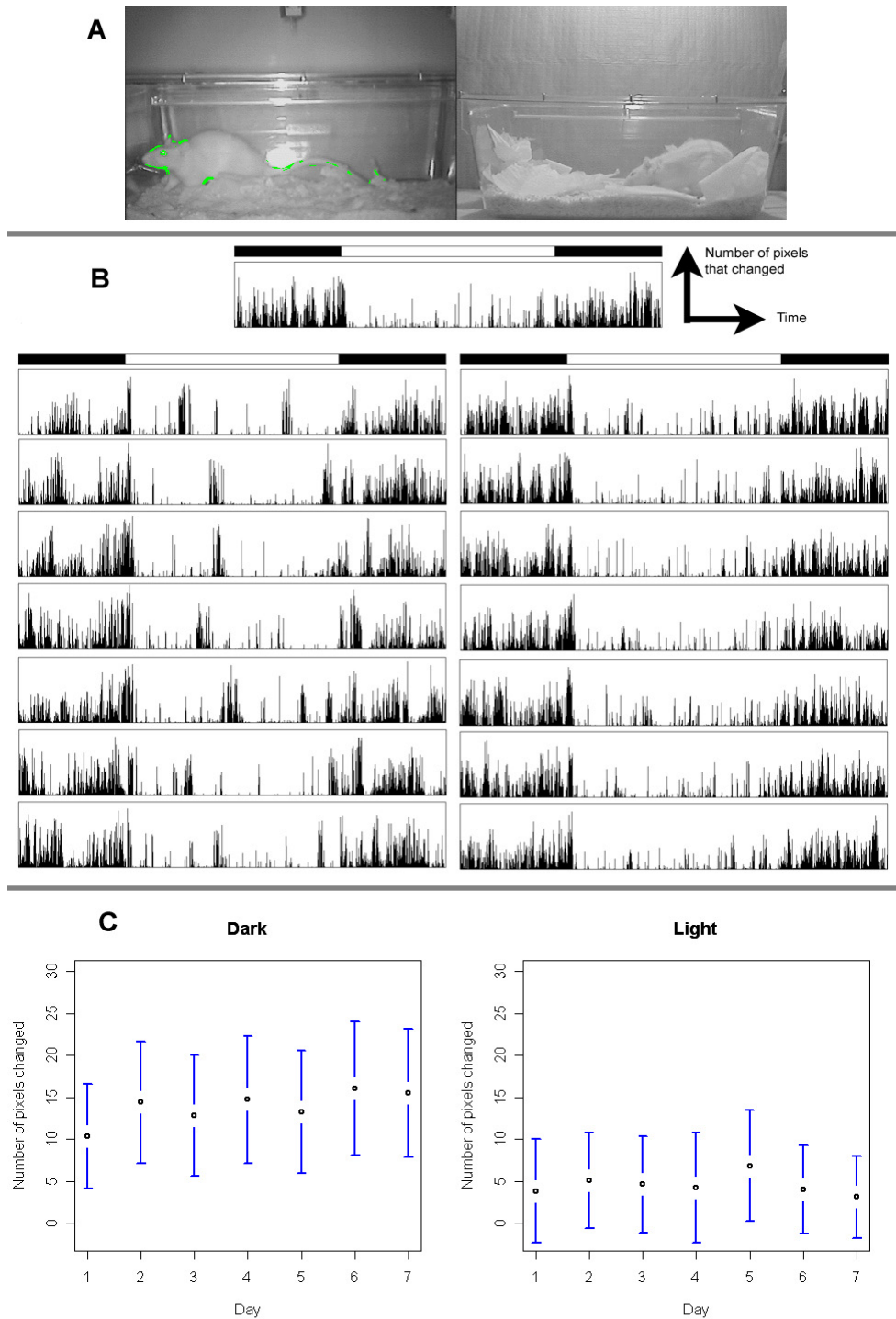


Figure 5

Data from software module I. A: screenshot showing the actual view of software module I. Green pixels highlight zones that changed since the last frame. Movements highlighted here were only observed around the head and the tail. Left: the rat is active; right: the rat is sleeping. B: Examples of actograms. Top: one day actogram for rat #1 (LD 12:12 with lights on at 6:00). Below: seven days actogram for rat #3 (left) and #6 (right). C: mean number of pixels changed each day for one rat (left: in dark conditions ; right: in light conditions).

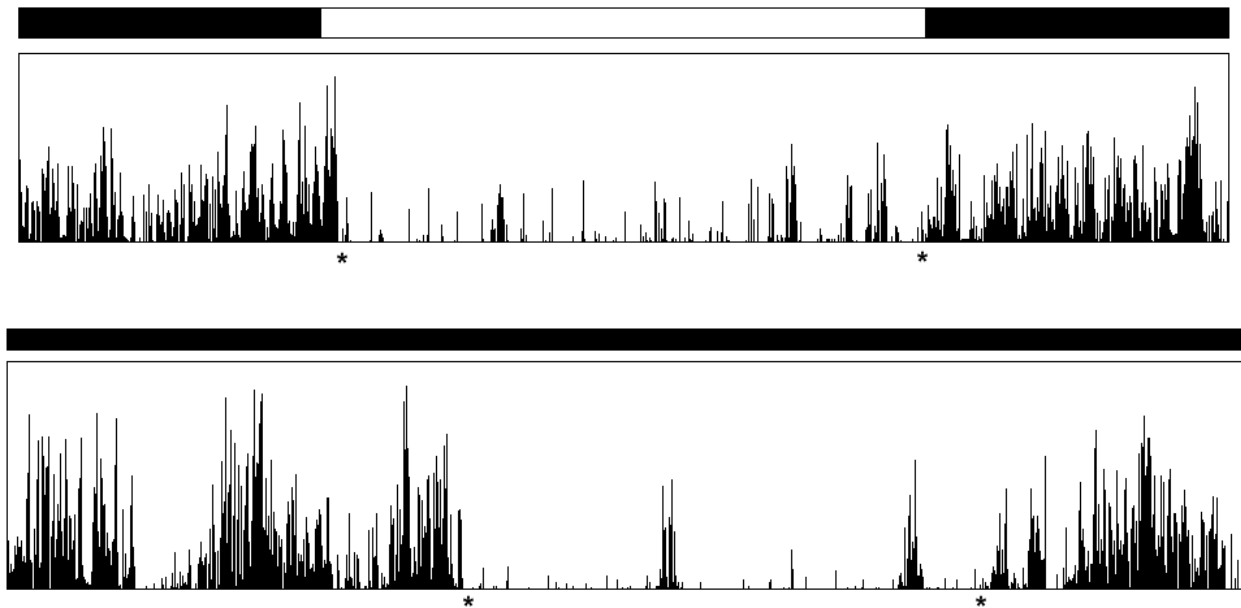


Figure 6

Activity of a rat in L:D and D:D conditions. Top: 3rd day in LD conditions ; bottom: 5th day under free-running, DD conditions ; a * denotes change in activity.

In summary, this method has many interesting advantages:

- all instruments are commercially available at comparatively low cost (a Pentium II computer can be found for less than US\$ 90.00 and our CCTV costs US\$ 70.00);
- the analysis procedure is performed automatically, and no skill is necessary;
- placed outside the animal environment, the data collection system does not influence the rhythmic physiological variables;
- the overall movements of animals can be estimated with high sensitivity;
- our system can easily be extended to the simultaneous monitoring of several animals;
- acquired data allows flexible and powerful analysis as well as a full integration in a bigger data collection framework (use of open formats).

These advantageous features make the Gemvid system a powerful device for overall movement assessment in rodents.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LP wrote the first module software and built the mobile device for the third experiment. JEP wrote the second module software, carried out the experiments, data analysis and prepared the successive versions of the manuscripts. PL and PM supervised the experiments. The study was conceived and planned by JEP. All authors approved the final version of the manuscript

Acknowledgements

This project was supported by the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, a Fonds Leon Fredericq Grant and an Andre Kahn Sleep Award.

References

1. Parreno A, Saraza ML, Subero C: **A new stabilimeter for small laboratory animals.** *Physiol Behav* 1985, **34**:475-178.
2. Pasquali V, Scannapieco E, Renzi P: **Validation of a microwave radar system for the monitoring of locomotor activity rhythms in mice.** *J Circadian Rhythms* 2006, **4**:7.
3. Kafkafi N, Mayo C, Draï D, Golani I, Elmer G: **Natural segmentation of the locomotor behavior of drug-induced rats in a photobeam cage.** *J Neurosci Methods* 2001, **109**:111-121.
4. Jud C, Schmutz I, Hampp G, Oster H, Albrecht U: **A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions.** *Biol Proced Online* 2005, **7**:101-116.
5. Hashimoto T, Izawa Y, Yokoyama H, Kato T, Moriizumi T: **A new video/computer method to measure the amount of overall**

- movement in experimental animals (two-dimensional object-difference method).** *J Neurosci Methods* 1999, **91**:115-122.
6. Yamada N, Shimoda K, Ohi K, Takahashi S, Takahashi K: **Free-access to a running wheel shortens the period of free-running rhythm in blinded rats.** *Physiol Behav* 1988, **42**:87-91.
 7. Koteja P, Swallow JG, Carter PA, Garland T: **Different effects of intensity and duration of locomotor activity on circadian period.** *J Biol Rhythms* 2003, **18**:491-501.
 8. Vorhees CV, Acuff-Smith KD, Minck DR, Butcher RE: **A method for measuring locomotor behavior in rodents: contrast-sensitive computer-controlled video tracking activity assessment in rats.** *Neurotoxicol Teratol* 1992, **14**:43-49.
 9. Togasaki DM, Hsu A, Samant M, Farzan B, DeLanney LE, Langston JW, Di Monte DA, Quirk M: **The Webcam system: a simple, automated, computer-based video system for quantitative measurement of movement in nonhuman primates.** *J Neurosci Methods* 2005, **145**:159-166.
 10. Moraes MF, Ferrarezi C, Mont'Alverne FJ, Garcia-Cairasco N: **Low-cost automatic activity data recording system.** *Braz J Med Biol Res* 1997, **30**:1009-1016.
 11. R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Vienna Austria R Foundation for Statistical Computing 2006.

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

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

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

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

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



A.2 SECONDE PUBLICATION

Proteomic changes in rat hippocampus and adrenals following short-term sleep deprivation

Jean-Etienne Poirrier^{1,2}, François Guillonnet³, Jenny Renaut⁴, Kjell Sergeant⁴, Andre Luxen², Pierre Maquet² and Pierre Leprince*¹

Address: ¹Center for Cellular and Molecular Neurobiology, University of Liege, CHU B36, Avenue de l'Hopital 1, B – 4000 Liege, Belgium, ²Cyclotron Research Center, University of Liege, B30, Allee du 6 Aout 8, B-4000 Liege, Belgium, ³Laboratory of Mass spectrometry, University of Liege, B6c, Allee de la Chimie 3, B-4000 Liege, Belgium and ⁴Centre de Recherche Public-Gabriel Lippmann, Department Environment and Agrobiotechnologies, Rue du Brill 41, L-4422 Belvaux, Luxembourg

Email: Jean-Etienne Poirrier - jepoirrier@student.ulg.ac.be; François Guillonnet - francois.guillonnet@univ-paris5.fr; Jenny Renaut - renaut@lippmann.lu; Kjell Sergeant - sergeant@lippmann.lu; Andre Luxen - aluxen@ulg.ac.be; Pierre Maquet - pmaquet@ulg.ac.be; Pierre Leprince* - pleprince@ulg.ac.be

* Corresponding author

Published: 22 May 2008

Received: 20 December 2007

Proteome Science 2008, 6:14 doi:10.1186/1477-5956-6-14

Accepted: 22 May 2008

This article is available from: <http://www.proteomesci.com/content/6/1/14>

© 2008 Poirrier et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: To identify the biochemical changes induced by sleep deprivation at a proteomic level, we compared the hippocampal proteome of rats either after 4 hours of sleep or sleep deprivation obtained by gentle handling. Because sleep deprivation might induce some stress, we also analyzed proteomic changes in rat adrenals in the same conditions. After sleep deprivation, proteins from both tissues were extracted and subjected to 2D-DIGE analysis followed by protein identification through mass spectrometry and database search.

Results: In the hippocampus, 87 spots showed significant variation between sleep and sleep deprivation, with more proteins showing higher abundance in the latter case. Of these, 16 proteins were present in sufficient amount for a sequencing attempt and among the 12 identified proteins, inferred affected cellular functions include cell metabolism, energy pathways, transport and vesicle trafficking, cytoskeleton and protein processing. Although we did not observe classical, macroscopic effect of stress in sleep-deprived rats, 47 protein spots showed significant variation in adrenal tissue between sleep and sleep deprivation, with more proteins showing higher abundance following sleep. Of these, 16 proteins were also present in sufficient amount for a sequencing attempt and among the 13 identified proteins, the most relevant cellular function that was affected was cell metabolism.

Conclusion: At a proteomic level, short term sleep deprivation is characterized by a higher expression of some proteins in the hippocampus and a lower abundance of other proteins in the adrenals (compared to normal sleep control). Altogether, this could indicate a general activation of a number of cellular mechanisms involved in the maintenance of wakefulness and in increased energy expenditure during sleep deprivation. These findings are relevant to suggested functions of sleep like energy repletion and the restoration of molecular stocks or a more global homeostasis of synaptic processes.

Background

Sleep is present in all vertebrate species studied so far suggesting that it might underpin one or several vital functions [1,2]. Sleep has been associated with functions as diverse as thermoregulation [3], energy conservation [4], immune defense [5], tissue restoration [6] and brain plasticity [7,8].

One way to approach the functions of sleep is to assess the effects of sleep deprivation on behavioral and physiological responses at the organism, tissue and cellular levels. Several studies addressing gene transcription through the sleep-wake cycle identified a number of genes that are differentially expressed during wakefulness and sleep (for reviews, see [9,10]). Physiological changes in cellular properties are eventually derived from gene transcription followed by gene translation and protein synthesis. In consequence, the characterization of protein changes that contribute to the cellular phenotype is an indispensable complement to genomic studies in understanding the link between cellular activity and behavior.

To our knowledge, at the present time, only one proteomic study of the effect of sleep deprivation has been published. Using classical 2D-gel electrophoresis, Basheer et al. studied levels of protein expression in the rat basal forebrain after 6 hours of sleep deprivation by gentle handling [11]. In this analysis, 89 spots showed more than a two-fold difference between 6 hours sleep-deprived rats and undisturbed sleeping controls. The fact that several identified proteins in their study either belong to the cytoskeleton or are closely associated with synaptic function suggests that changes in synaptic transmission or plasticity may occur after 6 hours of sleep deprivation in a wake-promoting area of the rat basal forebrain.

Since the hippocampus plays an important role in spatial memory [12], in humans [13] as well as in rodents [14] and sleep deprivation is known to disturb the memory consolidation process [15], our objective was to identify changes in protein levels occurring in the rat hippocampus after either a short (4 hours) period of sleep or of total sleep deprivation by gentle handling. Since the hippocampus is also a target of stress hormones [16], we measured stress by classical stress indices [17] (stomach ulceration, adrenal hypertrophy and body weight loss). We also looked at the proteomic changes in the rat adrenals after 4 hours sleep deprivation since adrenals are physiologically affected by sleep deprivation [18].

Results

Sleep deprivation

The activity of rats during 4 hours at the beginning of the light period was behaviorally scored. The mean duration of behaviorally scored sleep in undisturbed rats was 144.6

± 56.8 minutes. Sleep-deprived rats never slept during the 4 hours of sleep deprivation. Undisturbed rats were not awoken while sleep deprived rats were awoken 80.8 ± 22.5 times during the 4 hours. Figure 1 shows, for consecutive 30-min intervals, the number of interventions which were required to prevent the occurrence of sleep. The number of interventions increased progressively during the first 2 hours and then remained at a high level (except for the 5th interval, i.e. the period from 2h00 to 2h30). A one-way ANOVA for repeated measures revealed a significant effect of the factor "interval" ($p < 0.05$). Posthoc test (Tukey test) revealed significant increase in the number of interventions between the first half hour and the fourth to eighth ones and between the second half hour and the seventh and eighth intervals.

Stress indices

Rats were sacrificed immediately following the 4 hours of sleep or sleep-deprivation. The whole brain, hippocampus, stomach and adrenals were removed, weighed and stored at -80°C . The stomach was opened and, after careful observation, we were unable to find any ulceration. Adrenal weight was compared between sleep-deprived and undisturbed rats and no significant difference was found (Kruskal-Wallis, p -value > 0.05). Body weight also did not significantly change between the two groups (Kruskal-Wallis, p -value > 0.05).

Hippocampal proteins profiling by 2D-DIGE and identification of regulated proteins in undisturbed and sleep-deprived rats

Hippocampal proteins were extracted, labeled with either Cy3 or Cy5 CyDye and separated by isoelectric focusing

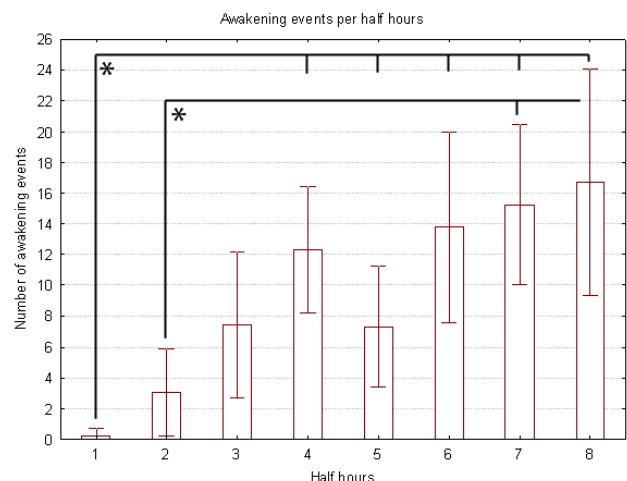


Figure 1
Number of interventions that were required to prevent the occurrence of sleep for consecutive 30-min intervals. Significant differences were observed between intervals 1-4 and 2-7-8.

Table 1: Hippocampal proteins whose abundance differs between conditions with protein ID from Swiss Prot database, analysis and identification information.

Master #	Protein ID	Name	Function	Average ratio	p-value	pI	Mw	Mowse score
1169	AINX_RAT	α -internexin	Y	-1.52	0.000082	5.2	56253	108
1166	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	D	-1.64	0.012	5.95	62638	100
1192	GDIA_RAT	Rab GDI α	G	-1.31	0.045	5	51074	100
1489	GFAP_RAT	Glial fibrillary acidic protein	Y	-1.35	0.04	5.35	49970	90
1781	KCRB_RAT	Creatine kinase type B	M	-1.26	0.045	5.33	42970	236
971	NSF_MOUSE	Vesicle fusing ATPase	T	-1.33	0.0067	6.52	83083	68
1753	NDUS2_MOUSE	NADH ubiquinone oxidoreductase	M	-1.22	0.012	6.52	52991	69
1230	PDIA3_RAT	Protein disulfide isomerase A3	C	1.83	0.033	5.88	57044	100
1869	PURA_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur- α	A	-1.23	0.025	6.07	34976	54
2462	SNAARAT	α -soluble NSF attachment protein	T	-1.37	0.017	5.3	33627	107
1131	TPMT_CANFA	Thiopurine S-methyltransferase	C	-1.42	0.0071	6.46	28752	87
532	YPEL4_RAT	Protein yippee-like 4	?	1.53	0.036	8.42	14762	44

In the Function column, A = transcriptional regulation, C = protein translation, folding and degradation, D = development, G = cell signalling, M = cell metabolism and energy, S = stress, chaperone, T = transport and vesicle trafficking, Y = cytoskeleton. In the Average ratio column, a negative number corresponds to a protein more abundant after 4 hours of sleep deprivation than 4 hours of sleep. The average ratio represents the ratio between the average protein abundances in the different conditions (n = 6), as computed by the DeCyder software. Other abbreviations: pI = identified isoelectric point ; Mw = identified molecular weight. Mowse score as defined by Pappin et al. [62]

between pH 4 and 7 (first dimension). After reduction and alkylation, proteins were then separated following their molecular weight in a second dimension electrophoresis. After scanning the gels, the images of the 2D distribution of hippocampal proteins were analysed. Figure 2 shows a representative bi-dimensional map of the proteome of sleep-deprived rat hippocampi. CyDyes protein labeling combined with automatic spot detection enables visualization of about 4000 individual spots on a 2-D gel. The protein pattern from 4 h sleep-deprived rat hippocampi (n = 6) was globally very similar to that of undisturbed rat (n = 6). However, after matching spots, 87 spots showed significant variation between sleep and sleep deprivation: 64 spots were upregulated by a factor 1.2 to 2.94 following 4 h sleep deprivation, while 23 spots were downregulated by a factor 1.2 to 2.74. From the 16 selected spots sent to the MALDI-TOF mass spectrometry, we unambiguously identified 12 proteins. Their name, accession number, change in relative abundance and other MS data are summarized in table 1.

Adrenals proteins profiling by 2D-DIGE and identification of regulated proteins in undisturbed and sleep-deprived rats

We next examined the effect on the adrenals proteome following the exposure of rats to 4 h of sleep deprivation. As for the hippocampal proteins, the protein pattern from 4 h sleep-deprived rat adrenals (n = 4) was globally very similar to that of undisturbed rat adrenals (n = 4). Fifty-seven spots were found to display a significant variation in relative abundance after 4 hours of sleep deprivation, compared to undisturbed rats: 18 spots were more abundant (factor of 1.21 to 1.62), whilst 39 spots were less

abundant by a factor of 1.20 to 4.72. From the 16 selected spots sent to the MALDI-TOF mass spectrometry, we unambiguously identified 13 proteins. Their name, accession number, change in relative abundance and other MS data are summarized in table 2.

Western blots

To confirm the validity of the quantitative data obtained in our proteomic analysis, we further performed selected western blots analysis on several samples to verify that our 2D-DIGE analysis indeed reflected true changes in tissue protein expression.

For the hippocampus, we exposed extracted proteins after separation by SDS-PAGE to antibodies directed against α -SNAP and NSF. After spot volume analysis, taking into account variations in sample loading revealed by the actin signal, the ratio of NSF between the sleep and sleep-deprivation conditions was -1.28 (similar to the value -1.33 from the DIGE analysis; figure 3). The ratio of α -SNAP between these two conditions was -1.15 (similar to the value -1.37 found in the DIGE analysis; figure 3).

We separated adrenals proteins by 1D-SDS-PAGE and exposed them to an antibody directed against glucose-6-phosphate dehydrogenase. After incubation with an ECL Plex fluorescent secondary antibody and scanning, the presence and abundance of the protein was analyzed (figure 4). After spot volume analysis taking into account variations in sample loading revealed by the actin signal, the ratio of glucose-6-phosphate dehydrogenase between the sleep and sleep-deprivation conditions was -1.47 (similar to the value of -1.49 from the DIGE analysis).

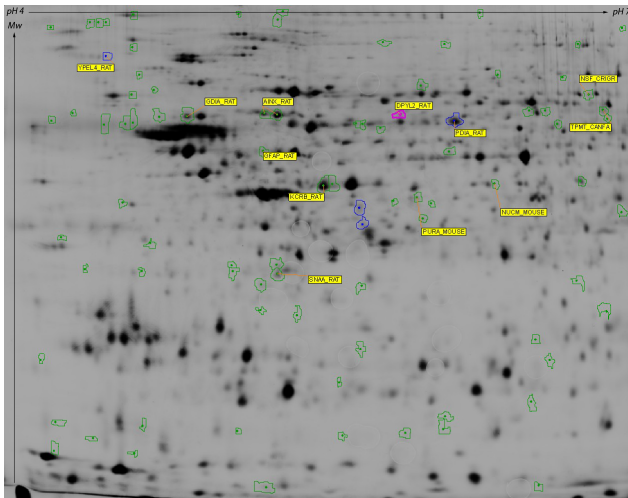


Figure 2
Representative bi-dimensional maps of the proteome of sleep-deprived rat hippocampi between pH 4 and 7. Delimited spots correspond to proteins of interest that were picked for mass spectrometry identification. ID of identified proteins from table 1 are indicated in yellow boxes.

Discussion

In this work we were able to identify, through proteomic analysis, 31 proteins the abundance of which was modified in hippocampal or adrenal tissues after 4 hours of sleep deprivation by gentle handling as compared to a similar period of sleep. In the discussion below, proteins that are more expressed in rat left undisturbed have positive ratios while proteins that increase after sleep deprivation display negative ratios. Most of the identified proteins in hippocampi were more abundant after short term sleep deprivation than after normal sleep. This result is consistent with transcriptomic studies in which sleep deprivation induced the over-expression of selected mRNAs in the hippocampus [19]: most genes are consistently upregulated during/after waking and short-term sleep deprivation relative to sleep [9]. Surprisingly, most of the identified proteins in the adrenals were more abundant after normal sleep than after short term sleep deprivation. It should however be cautioned that the occurrence of higher protein levels in one behavioral state relative to another may not only reflect an increase in translation rate but also a reduced degradation of proteins, a post-translational modification of proteins or a combination of these events. 2D-DIGE, the technique employed in this work, while allowing the detection of subtle differences in protein properties or abundance, does not permit to distinguish between these possibilities.

By using an advanced quantitative multiplex fluorescence immunoblotting methodology, we were able to quantita-

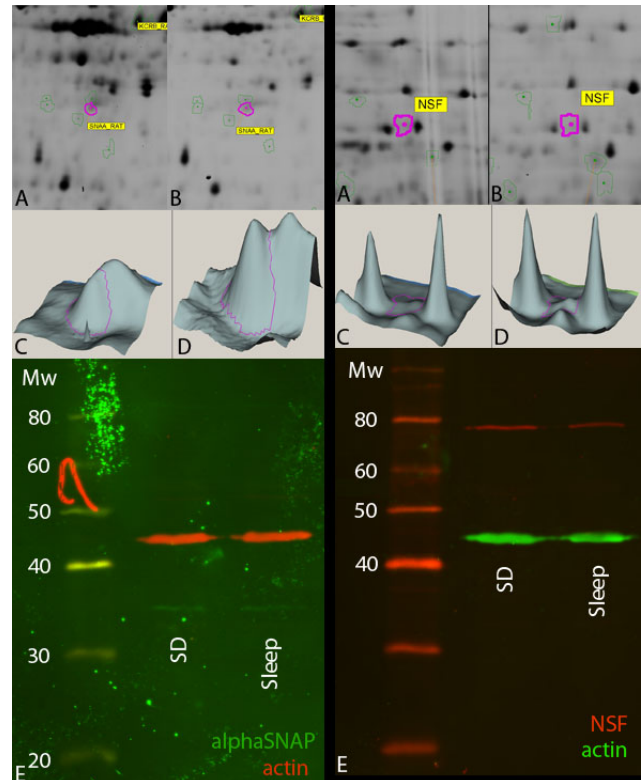


Figure 3
Representative 2D gel regions (A, B), 3D visualization of the spot contour in purple (C, D) and western blots (E) for NSF (left set of images) and alpha-SNAP (right set of images). Average ratio from 2D-DIGE analysis of the spot containing NSF was -1.33 (n = 9); average band volume ratio from western blot analysis was -1.28 (n = 3). Average ratio from 2D-DIGE analysis of the spot containing alpha-SNAP was -1.37 (n = 9); average band volume ratio from western blot analysis was -1.15 (n = 3). For all western blots, the variations in sample loading revealed by the actin signal is taken into account for the calculation of the average band volume ratio.

tively confirm the differences in abundances of NSF and α -SNAP in the hippocampus and G6PD in the adrenals of rats.

Identification of proteins in hippocampus of sleep-deprived rats

In the hippocampus of sleep-deprived rats, proteins showing a higher abundance participate in five main functions: cell metabolism, energy pathways, transport and vesicle trafficking, cytoskeleton and protein processing (translation, folding and degradation). Importantly, no protein related to stress response were identified in the hippocampus although cellular stress response genes were upregulated after 3–8 h of spontaneous waking [9].

Table 2: Adrenal proteins whose abundance differs in the two conditions (n = 4) with protein ID from Swiss Prot database, analysis and identification information.

Master #	Protein ID	Name	Function	Average ratio	p-value	pl	Mw	Mowse score
1372	G6PD_RAT	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	M	-1.49	0.0097	5.97	59375	103
2107	AIM_RAT	α -1-macroglobulin	M	-1.27	0.018	6.42	167125	166
2744	CLIC4_RAT	Chloride intracellular channel protein 4	T	-1.25	0.046	5.93	28502	-
1525	Q4KLG7_RAT	Serine hydroxymethyltransferase I	M	1.23	0.047	6.96	38106	241
2912	STAR_RAT	Steroidogenic acute regulatory protein	A	1.24	0.016	8.93	31501	141
1151	ALBU_RAT	Serum albumin	M	1.27	0.041	5.8	65916	45
1032	GRP78_RAT	Heat shock 70kD protein 5	T	1.28	0.034	5.01	70475	302
1438	SYDC_RAT	Aspartyl-tRNA synthetase	C	1.31	0.0042	6.02	57126	348
2038	NDUAA_RAT	NADH dehydrogenase I α	M	1.71	0.048	5.96	36843	98
1503	AL9A1_RAT	Aldehyde dehydrogenase family 9, subfamily A1	M	1.79	0.027	7.94	54327	236
1551	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase precursor	M	1.93	0.031	5.69	54368	344
1361	CES3_RAT	Carboxylesterase	M	2.05	0.029	6	60054	180
1537	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase precursor	M	2.32	0.021	5.69	54368	482

All proteins were identified by PMF except one without Mowse score which was identified by MS/MS. Same notes as in table 1.

All the functions attributed to proteins the abundance of which increases after sleep deprivation, require energy. An increase in the expression of genes related to energy metabolism has already been described in the literature [20]. Our results support the hypothesis of a fast adaptation of neurons and/or glial cells to the increased metabolic demand of wakefulness relative to sleep [20]. They are also consistent with an increase in energy requirement possibly related to a progressive increase in synaptic strength with prolonged wakefulness [21] (although none of the proteins identified here are the products of gene markers for synaptic potentiation [22]).

Accordingly, two central enzymes for cellular energy metabolism were identified. Creatine kinase (ratio of -1.26), a major enzyme of the phosphotransfer system in cells, plays a central role in energy transduction in tissues with large, fluctuating energy demands (such as skeletal muscle, heart, brain and spermatozoa) [23]. It acts in concert with other enzymatic systems to facilitate intracellular energetic communication (creatine kinase/phosphocreatine "spatial energy transport" system [23]) and is responsible for maintaining the phosphocreatine levels, an acute energy reserve [24]. Creatine kinase is a cytoplasmic protein also expressed in the mitochondrion whereas NADH ubiquinone oxidoreductase (aka. Complex I, ratio of -1.22) is only expressed in the latter. NADH ubiquinone oxidoreductase catalyzes the oxidation of NADH, the reduction of ubiquinone, and the translocation of 4H⁺ across the coupling, inner-mitochondrial membrane eventually leading to ATP synthesis [25].

The increased abundance of Rab GDI α (ratio of -1.31), vesicle fusing ATPase (NSF) (ratio of -1.33) and the α -soluble NSF attachment protein (α -SNAP) (ratio of -1.37) in the hippocampus suggests an increased regulation of

transport and vesicle trafficking, especially the docking and dissociation of vesicles to their target organelles. As proteins interacting with SNARE, α -SNAP and NSF play a central role in the specificity of the docking between a vesicle and its target membrane [26]. After vesicle docking, NSF will dissociate SNARE pairs and thus control the time and location of membrane fusion. Finally, Rab GDI α is an important factor in the control of Rab and thus the specificity of vesicular transport. By binding Rab, released after membrane fusion, Rab GDI prevents Rab from releasing its GDP molecule until it has interacted with appropriate proteins in the donor membrane [27,28]. This increased regulation of vesicle trafficking could underlie a general increase in synaptic activity reflecting the induced motor activity and alertness as well as a reaction to a stressful situation. Interestingly, several authors have found a related increase in gene transcription in the cerebral cortex of undisturbed rats (calcineurin, CaMKIV and the Rab family of genes, see [29,30]).

α -soluble NSF attachment protein is also the only protein from our study that is related to the β -soluble NSF attachment protein, found by Basheer et al. in the only other proteomic study of the effects of sleep deprivation published so far [11]. These two proteins are very similar in sequence and have the same functions in the cell. However, the abundance of the α -soluble NSF attachment protein is increased after sleep deprivation while the expression of the β -soluble NSF attachment protein is decreased after sleep deprivation. This discrepancy could be explained by the fact changes in cytoskeletal proteins after sleep deprivation could go in various directions depending on the precise need of synapses (since we use a different duration and study a different brain area than Basheer et al.).

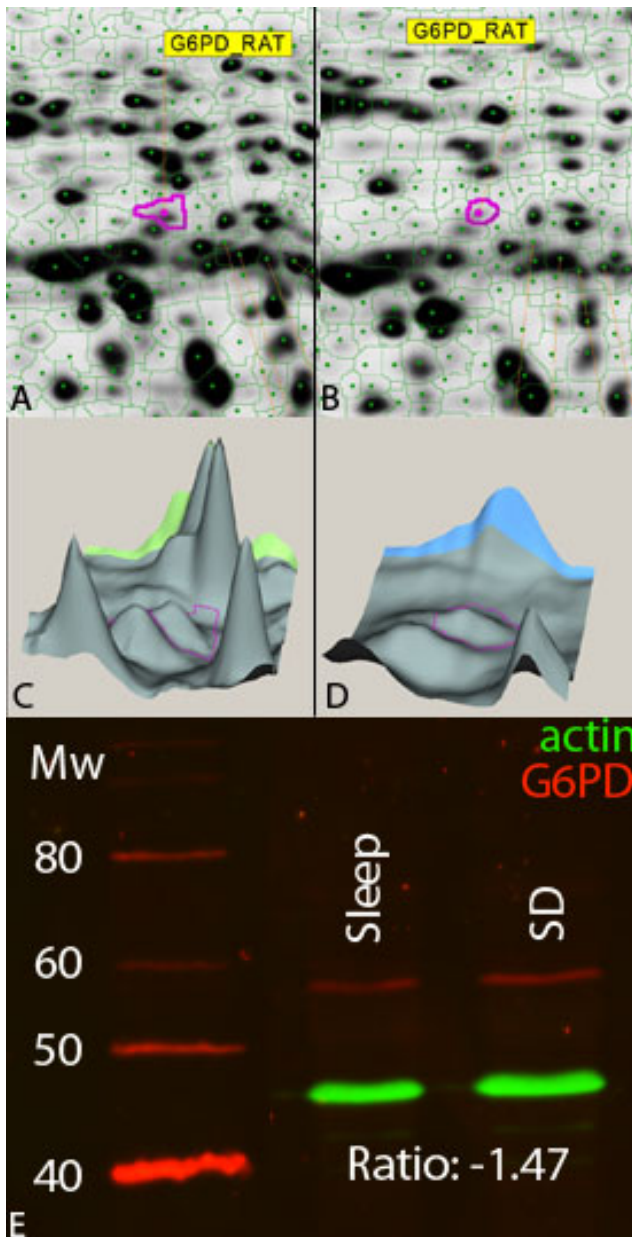


Figure 4
Representative 2D gel regions (A, B), 3D visualization (C, D) and western blots (E) for Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Average ratio from 2D-DIGE analysis of the spot containing Glucose-6-phosphate dehydrogenase was -1.49 ($n = 9$); average band volume ratio from western blot analysis is -1.47 ($n = 3$). Variations in sample loading revealed by the actin signal is taken into account for the calculation of the average band volume ratio.

Sleep deprivation increases at least two proteins related to cytoskeletal function, neural development and synaptic plasticity: α -internexin and GFAP. α -Internexin (a compo-

nent of intermediate filaments, ratio of -1.52) is a marker of neuronal tissue and a critical protein for neuronal development [31]. Thus its increased abundance, after a short-term sleep deprivation in the rat hippocampus, may indicate the presence of new neurons or their morphological modification to fit a possible synaptic potentiation [21]. Its importance for axonal caliber and nerve conduction speed, along with its correlation with glutamate transporter levels in the energetically compromised post-injury brain [32] gives α -internexin a potential role in energy homeostasis. Other studies also found it upregulated after voluntary exercise [33] in the same way as expression of LTP-related genes increased during extensive exploration [34]. All in all, this higher abundance of α -internexin seems to be consistent with the homeostatic synaptic hypothesis [21]. Here, since the duration of the sleep deprivation episode is probably too short to elicit neuron proliferation, the change in α -internexin abundance would simply be due to post-translational modifications related to synaptic plasticity.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (ratio of -1.35) is a major component of the glial astrocyte cytoskeleton and is generally used as a hallmark of mature astrocytes [35]. GFAP controls astrocyte motility and shape by providing structural stability to extensions of astrocytic processes but again the duration of the sleep deprivation episode is probably too short to elicit astrocyte proliferation. The observed increase in the abundance of GFAP in one spot may indicate an effect of sleep deprivation on cognitive function and synaptic plasticity. Indeed as both inhibitory avoidance and habituation alter the *in vitro* phosphorylation of GFAP [36], the observed change in abundance of GFAP in one spot might reflect such post-translational modification underlying a change in synaptic activity and/or efficacy induced by a stressful situation.

Dihydropyrimidinase-related protein 2 (ratio of -1.64) plays an important role in axon specification and elongation by regulating microtubule assembly, endocytosis of adhesion molecules, reorganization of actin filaments, and axonal protein trafficking [37]. In the adult brain, the expression of dihydropyrimidinase-related protein 2 is dramatically downregulated [38]. However, it remains expressed in structures that retain their capacity for differentiation and plasticity as well as in a subpopulation of oligodendrocytes. One hypothesis could be that this protein may be involved in neuron plasticity in the hippocampus during sleep deprivation.

Finally, since the transcriptional activator protein Pur- α has been implicated in diverse cellular functions, including transcriptional activation and repression, translation and cell growth [39], its increased abundance (ratio of -1.23) may indicate an increase in DNA transcription and

translation, compatible with a general increase of cellular activity. This could indicate a genomic process beginning during the short sleep deprivation event possibly leading to broader DNA transcription in case the sleep deprivation duration increases.

Identification of proteins in hippocampus of undisturbed rats

Interestingly, two proteins were more abundant in the hippocampus during sleep, as compared to total sleep deprivation. Protein disulfide isomerase A3 (ratio of +1.83) was found to be more expressed in the hippocampus of undisturbed than of sleep-deprived rat. Protein disulfide-isomerase A3 is expressed in higher amounts in ischemia (another form of stress) in heart [40]. It also modulates the redox state of the endoplasmic reticulum (ER), providing control of the ER Ca^{2+} homeostasis [41]. But its two main roles are to catalyze disulfide bond formation and isomerisation in proteins and to inhibit their aggregation [42]. Disulfide bonds play a major role in the folding and stability of many proteins. As different authors suggested an involvement of sleep in protein synthesis [29], an increased protein disulfide isomerase A3 activity may be involved in the control of the proper folding of newly synthesized proteins. This suggestion deserves two qualifications. First, since the sleep episodes were short in our experiment, protein disulfide isomerase A3 could rather be involved in the control of the release of previously inactivated proteins, a process that could be faster than an activation and translation of genes related to sleep [9]. Second, we do not argue that sleep generally promotes protein translation, folding and degradation. Indeed, thiopurine S-methyltransferase (ratio of -1.42) also plays several roles in protein folding depending on its polymorphism and catalyzes the AdoMet-dependent S-methylation of thiopurine drugs such as 6-mercaptopurine [43] and is more abundant in the hippocampus after sleep deprivation.

Also, present in higher abundance in undisturbed rats, YPEL4 (ratio of 1.53) is a protein whose gene is highly conserved and expressed in various eukaryotic organisms [44]. This suggests that it must play important roles in the maintenance of life. Moreover, its subcellular localization (in association with centrosome or mitotic spindle) suggests a function in cell division. Unfortunately, its real function has not been uncovered yet.

Sleep deprivation and the confounding effect of stress

The number of manipulations which were required to prevent the occurrence of sleep increased with the time spent in the experiment, demonstrating an increase of the sleep propensity. The rate of interventions reached a plateau after 3 hours, at the time when the rats' sleep propensity was at its highest [45]. This result is consistent with a pre-

vious study in which 3 hours of sleep deprivation triggers the homeostatic regulation of sleep, as indicated by subsequent episodes of sleep rebound [46].

An important issue for the interpretation of these results is to assess whether the higher abundance of some proteins is associated with wakefulness or rather reflects the consequences of stress. To address this issue, we characterized the effects of stress at two levels of description. First, at the macroscopic level, there was no evidence for sleep deprivation being stressful: we could not observe any stomach ulceration, any adrenal hypertrophy or any body weight loss in our rats. This could be expected as the stress duration was probably too short to induce the responses typically observed after 72 hours [47]. Second, at a molecular level, we characterized the protein patterns in adrenals of sleep-deprived rats.

Identification of proteins in adrenals of undisturbed rats

Interestingly, we found more proteins with an increased abundance in the adrenals from rat left undisturbed as compared to adrenals of sleep-deprived rats, an opposite trend to what we found in the hippocampi. Most proteins identified in adrenals and more abundant in undisturbed rats belong to cell metabolism. They catalyze the transformation of carboxylic ester (carboxylesterase, ratio of +2.05), aldehyde (aldehyde dehydrogenase, ratios of +1.93 and +2.32), trimethylaminobutyraldehyde (aldehyde dehydrogenase family 9 subfamily A1, ratio of +1.79) and serine (serine hydroxymethyltransferase, ratio of +1.23). One protein is also specifically involved in the synthesis of ATP: NADH dehydrogenase 1 α (ratio of +1.71). This potential increase in ATP production can be advantageous for the increased activity in the metabolic pathways cited above.

Some identified proteins are involved in protein assembly and the regulation of transcription. In the mitochondrion, the steroidogenic acute regulatory protein (ratio of +1.24) enhances the transport of cholesterol and its metabolism into pregnenolone, a steroid hormone involved in steroidogenesis (of progesterone, androgens and estrogens a.o.) [48]. In the endoplasmic reticulum, the heat shock 70kDa protein 5 (ratio + 1.28) facilitates the assembly of multimeric protein complexes. And finally, in the cytoplasm, aspartyl t-RNA synthase (ratio of +1.31) assembles L-aspartyl and a t-RNA and consumes ATP. By getting involved in various metabolic steps and in various cell compartments, the increase in abundance of these proteins indicates an increase in protein transcription.

All these identified proteins contribute to the view of sleep as a mechanism of energy repletion [4] and restoration of molecular stocks [2].

Finally, serum albumin (ratio of +1.27), the most abundant blood plasma protein, can be considered here as an experimental artifact.

Identification of proteins in adrenals of sleep-deprived rats

Another argument in favor of the absence of physiological stress due to sleep deprivation by gentle handling for 4 hours is the relatively low number of proteins the abundance of which increases in the adrenals of sleep-deprived rats. However one important protein identified here is glucose-6-phosphate dehydrogenase (ratio of -1.49). This enzyme catalyzes the first step of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway. It is thus involved in the synthesis of NADPH that may counteract oxidative stress generated following sleep-deprivation [49].

Stress can also be an important factor in the higher abundance of chloride intracellular channel protein 4 (ratio of -1.25) as chloride channels are important for maintaining a proper cell volume and cell resting membrane potential [50]. These two important factors can be modified by stress at a cellular level.

α -1-Macroglobulin (ratio of -1.27) is a widely expressed protein able to inhibit proteinases [51]. Its presence here could be explained by the fact that it is also an inhibitor of coagulation and could then be treated as an artifact rather than as a protein with a precise physiological function.

Conclusion

By using a proteomic approach, this study has demonstrated that a short-term sleep deprivation affects various networks of proteins mainly related to cell metabolism, energy pathways, transport and vesicle trafficking, cytoskeleton and protein processing (translation, folding and degradation) in the hippocampus, a brain region central to cognition. The overall increase in abundance of these proteins in the sleep-deprived condition could indicate a general activation of a large number of cellular mechanisms involved in the maintenance of wakefulness, energy metabolism and maybe some cognitive function. The use of a CyDye immunoblotting method allowed us to quantitatively confirm the differences in abundances of several proteins, both in the hippocampus and the adrenals of rats.

Although we did not find any sign of behavioral stress, a difference in protein abundance was observed between sleep-deprived and undisturbed rat adrenals. This trend is in opposition to the one observed in hippocampi, with more proteins more abundant in the undisturbed condition compared to the sleep-deprived condition. This finding contributes to the view of sleep as a mechanism of

energy repletion [4] and restoration of molecular stocks [2].

One should pay attention to two important points. First, our comparative approach detected not only proteins that are produced or degraded to higher levels after sleep or sleep-deprivation, but also proteins subjected to post-translational modifications, leading to a change in isoelectric point and/or molecular mass of their constituting subunits. Second, we only looked at the acidic part of the proteome. We were then unable to spot differences in the abundance of, for example, the early growth response protein (EGR1), a protein with an alkaline isoelectric point which is translated from a well-known experience-modulated gene [52].

An interesting question arising from these findings, to be explored by future research, is how sleep deprivation interacts at a molecular level with cognitive processes since sleep deprivation disrupts the processing of recent memory traces [53] and extends the effects of synaptic potentiation on subsequent homeostatic processes [21]. It will also be interesting to look at the differences in proteins abundances at different time points in the sleep deprivation.

Methods

Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 170–220 g at the start of the experiment were housed by pairs and maintained in a 12-h light-dark cycle with lights on at 08:00, with standard food (PLUS type, SAFE) and water available ad libitum. Rats were accustomed to the housing facilities for at least 7 days prior to the beginning of any experiments. All experiments were approved by the Animal Ethical Committee of the University of Liege.

Sleep-deprivation and alertness state monitoring

In the first group, rats ($n = 9$) were sleep-deprived by gentle handling [54]. The animals were continuously observed during 4 hours at the beginning of the light period. Sleep deprivation was achieved by disturbing the cage bedding around the rat, stroking the vibrissae using a small brush and gently stroking the fur with the brush when the rat assumes a sleep posture [55]. In the second group, rats ($n = 9$) were left undisturbed during these 4 hours.

Alertness state was monitored by two means: an automated activity recording setup and program, Gemvid [56], developed in our laboratory, and manual behavioral scoring. For each rat, the alertness level was determined during the light period before the test. Scores below this level during the test were considered as rest/sleep. Rat behavior was also manually scored by selecting alertness states as soon

as they occurred with software developed in our laboratory. The following alertness states were defined: rest/sleep, movement, eating, washing, foraging, and environment exploration. The software allowed the quantification of the number and duration of rest/sleep periods as well as the number and frequency of manual awakenings for sleep-deprived rats. Statistical analyses (ANOVA, Tukey and Kruskal-Wallis methods) were performed in Statistica 7.1 (Statsoft).

All rats were weighed before and after the observation.

Adrenals, hippocampus and protein extraction

Rats were decapitated immediately after the 4 hour period of sleep or sleep deprivation, and the brains were quickly removed and dissected on ice. The hippocampi were extracted from the brain according to Hortnagl et al. [57], weighed and quickly frozen at -80°C . The rat thoracic cavity was opened, the viscera were removed and adrenals were cut, weighed and quickly frozen at -80°C .

Proteins were extracted by 10 strokes of a Potter homogenizer in a lysis buffer containing 7 M urea (ICN), 2 M thiourea (GE Healthcare), 30 mM Tris at pH 8.5, and 2% ASB-14 (Sigma). The supernatant containing the solubilised proteins was precipitated using the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) and protein amounts were determined with the RC DC Protein Assay (Bio-Rad).

The stomach was cut along the smaller curvature, cleaned, pinned on an inspection board and examined for ulcerations.

Protein labeling and 2-D Differential in-gel electrophoresis

CyDyes minimal labeling was performed according to the procedure published by Tonge et al. [58] with minor modifications. Briefly, each 25 μg of sample protein was mixed with 200 pmol of CyDyes (GE Healthcare) reconstituted in anhydrous dimethylformamide (Aldrich), according to its labeling group, and left for 30 minutes in the dark, at $+4^{\circ}\text{C}$. The coupling reaction was then stopped by adding the same volume of 10 mM lysine (Acros) for 10 minutes at $+4^{\circ}\text{C}$. An internal standard was prepared by mixing equal amounts of all the samples within the experiment. Experimental samples were either labeled with Cy3 or Cy5. Then they were mixed in pairs together with 25 μg of the internal standard labeled with Cy2. For the first dimension (isoelectric focusing), a rehydration buffer was added to each analytical sample. For preparative gels, the rehydration buffer was added to 250 μg of unlabelled proteins. This buffer contained 7 M urea, 2 M thiourea, 2% ASB-14, 0.2% dithiothreitol and 0.5% IPG buffer 4-7 (GE Healthcare). The solution was then poured in a strip holder, covered with a pH 4-7 IPG strip (GE Healthcare) and finally covered with 1 ml PlusOne DryStrip cover

fluid (GE Healthcare). The following electrophoresis steps were successively applied: 12 hours of rehydration, 1 hour at 500V (step-and-hold), 1 hour to 1000V (gradient), 3 hours to 8000V (gradient) and 5.5 hours at 8000V (step-and-hold).

Before initiating the second dimension step, proteins in IPG strips were reduced in an equilibration solution (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol (Bio-Rad) et 1.6% SDS (MP Biomedicals)) containing 1% DTT. They were then alkylated in the same equilibration solution containing 5% iodoacetamide (GE Healthcare).

IPG strips were placed on top of a classical SDS-PAGE gel (12.5% acrylamide (GE Healthcare)).

Electrophoretic migration was performed in an Ettan Dalt six apparatus (GE Healthcare) at 2.5 W per gel during 30 minutes and then 100 W for a maximum of 4 hours.

Once the second dimension step was realized, each gel was scanned at three different wavelengths corresponding to the different CyDyes with a Typhoon 9400 Laser Scanner (GE Healthcare). Gel images were cropped with the ImageQuant 5.2 program (Molecular Dynamics) in such a way that all the images represented the same area.

Spot detection and pattern analysis

After scanning the gels, 2-D gel analysis software (DeCyder version 6.5, GE Healthcare) was used in this study for spot detection, gel matching and spot quantification relative to the corresponding spot in the internal standard [59]. After matching, spots showing a statistically significant variation in relative abundance of at least 1.2 fold (Student t test, $p < 0.05$) and a minimal volume of 250,000 were selected for further analysis (Biological Variation Analysis (BVA) module of Decyder software). All spots considered by the software as significantly regulated at a threshold of ± 1.2 were visually checked, possibly selected and a pick list was created containing all spots with proteins sent to mass spectrometry.

Spot excision, digestion and identification of proteins

All differentially expressed spots were automatically excised from the gels with an Ettan Spot Picker robot (GE Healthcare). The picker head had a diameter of 2.0 mm. Gel pieces were collected in 96-well plates designed for the digestion of proteins.

For hippocampal protein digestion, gel pieces are collected in 96-well plates designed for the Proteineer dp automated digester (Bruker Daltonics). Briefly: gels pieces are washed with 3 cycles of successive soaking in 100% ammonium hydrogenocarbonate 50 mM and a mix of 50% acetonitrile/50% ammonium hydrogenocarbonate

50 mM. Two additional washes are performed with 100% acetonitrile to dehydrate the gel pieces. 3 μ l of freshly activated trypsin (Roche, bovine, sequencing grade) 10 ng/ μ l in ammonium hydrogenocarbonate is used to rehydrate the gel pieces at +8°C for 30 minutes. Trypsin digestion is performed for 3 h at 30°C. Peptide extraction is performed with 10 μ l of 1% formic acid for 30 minutes at 20°C. Hippocampal protein digests (3 μ l) are then adsorbed for 3 minutes on prespotted anchorchips (Bruker). Spots are washed on-target using 10 mM dihydrogeno-ammonium phosphate in 0.1% TFA-MilliQ water to remove salts. High throughput spectra acquisition is performed using an Ultraflex II MALDI mass spectrometer (Bruker) in positive reflectron mode, with close calibration enabled, Smartbeam laser focus set to medium, and a laser fluency setting of 65 to 72% of the maximum. Delayed extraction is set to 30 ns. Steps of 100 spectra in the range of 860 to 3800 Da are acquired at a 200 Hz LASER shot frequency with automated evaluation of intensity, resolution and mass range. 600 successful spectra per sample are summed, treated and de-isotoped in line with an automated SNAP algorithm using Flex Analysis 2.4 software (Bruker), and subsequently submitted in the batch mode of the Biotools 3.0 software suite (Bruker) with an in-house hosted Mascot search engine (MatrixScience.com) to the NCBI rodent database. The Swiss-Prot 50.5 release and NCBI nr_20060605 release databases are used for the rat species. A mass tolerance of 100 ppm with close calibration and one missing cleavage site are allowed. Partial oxidation of methionine residues and complete carbamylation of cysteine residues are considered. The probability score calculated by the software was used as a primary criterion for correct identification. For mascot scores slightly above the threshold of p value, measurement errors were carefully watched to detect possible false positive that usually give random mass measurement errors, while relevant identifications give constant measurement errors. Experimental and Mascot results molecular weights and pI were also compared. Adrenal protein digestion and spotting on Maldi targets have been carried out as previously described in Bohler et al. [60]. Peptide mass determinations (PMF and MS/MS) were carried out using the Applied Biosystems 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Calibration was performed with the peptide mass calibration kit for 4700 (Applied Biosystems). Proteins were identified by searching against an in-house database downloaded from NCBI and by using Mascot (MatrixScience.com). The parameters for search in database allowed 2 missed cleavages, a tolerance of 0.5 Da on MS/MS fragments and 100 ppm on precursor mass, as well as carbamidomethylation on cysteine and oxidation of methionine as fixed modifications. For both identification, the probability score (Mowse score [61]) calculated by the software was used as a criterion for correct identification.

Western blots

To confirm the presence of some proteins and the difference between abundance levels, 1D western blots were performed with the same protein samples used in the proteomic analysis. α -SNAP and NSF were detected in the hippocampal protein extracts with mouse monoclonal antibodies (ab16391, concentration 1 μ g/ml; ab16681, dilution 1/2000, Abcam). Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adrenals was detected with a rabbit polyclonal antibody (ab993, dilution 1/1000, Abcam).

For western blots, 50 μ g of proteins was combined with an equal volume of Laemmli buffer and separated by electrophoresis performed on a 12% SDS-PAGE with a 4% stacking gel (in a Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). A molecular weight ladder was separated along with the proteins of interest (MagicMark, Invitrogen). Proteins in the gel were then electrophoretically transferred (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell) to a 0.2- μ m low-fluorescent PVDF membrane (Hybond-LFP, Amersham). The membrane was blocked with 3% nonfat dry milk in Tween-Tris-buffered saline (TTBS) for 1 h at room temperature and incubated with the corresponding primary antibody in TTBS with 3% dry milk overnight at +4°C with gentle shaking. The membrane was washed with TTBS three times (10 minutes each), incubated in either ECL Plex goat-anti-mouse IgG Cy3 or goat-anti-rabbit Cy5-conjugated secondary antibody (dilution 1/2500, GE Healthcare) for 1 hour at room temperature and washed again three times in TTBS (15 minutes each). Membranes were then washed twice in TBS (15 minutes each). After drying at +37°C, membranes were scanned at the corresponding wavelengths with a Typhoon 9400 Laser Scanner (GE Healthcare). Membrane images were analyzed with the ImageMaster 1D software (GE Healthcare).

Authors' contributions

JEP designed and conceived the study, carried out the behavioral and proteomics experiments and drafted the manuscript. FG carried out part of the identification of hippocampal proteins. JR and KS carried out the identification of adrenal proteins. AL and PM participated in the design and coordination of the study. PL conceived the study and participated in its design and coordination. All authors helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank P. Piscicelli, L. Confetti and Y. Dohogne for their excellent technical assistance. This research was made possible by grants from the "Fonds pour la formation a la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture" (JEP), the Fonds Leon Fredericq (JEP), the Fonds National de la Recherche Scientifique (JEP, PM, PL) and the Belgian Association for Sleep Research and Sleep Medicine (JEP).

References

1. Rechtschaffen A: **Current perspectives on the function of sleep.** *Perspectives in biology and medicine* 1998, **41(3)**:359-390.
2. Frank M: **The mystery of sleep function: current perspectives and future directions.** *Reviews in the neurosciences* 2006, **17(4)**:375-392.
3. McGinty D, Szymusiak R: **Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep.** *Trends in neurosciences* 1990, **13(12)**:480-487.
4. Berger R, Phillips N: **Energy conservation and sleep.** *Behavioural brain research* 1995, **69(1-2)**:65-73.
5. Everson C: **Sustained sleep deprivation impairs host defense.** *The American journal of physiology* 1993, **265(5 Pt 2)**:R1148-R1154.
6. Adam K, Oswald I: **Sleep is for tissue restoration.** *Journal of the Royal College of Physicians of London* 1977, **11(4)**:376-388.
7. Dang-Vu T, Desseilles M, Peigneux P, Maquet P: **A role for sleep in brain plasticity.** *Pediatric rehabilitation* 2006, **9(2)**:98-118.
8. Walker M, Stickgold R: **Sleep, memory, and plasticity.** *Annual review of psychology* 2006, **57**:139-166.
9. Cirelli C: **Cellular consequences of sleep deprivation in the brain.** *Sleep medicine reviews* 2006, **10(5)**:307-321.
10. Porkka-Heiskanen T: **Gene expression during sleep, wakefulness and sleep deprivation.** *Frontiers in bioscience* 2003, **8**:s421-s437.
11. Basheer R, Brown R, Ramesh V, Begum S, McCarley R: **Sleep deprivation-induced protein changes in basal forebrain: implications for synaptic plasticity.** *Journal of neuroscience research* 2005, **82(5)**:650-658.
12. Born J, Rasch B, Gais S: **Sleep to remember.** *Neuroscientist* 2006, **12(5)**:410-424.
13. Cipolotti L, Bird C: **Amnesia and the hippocampus.** *Current opinion in neurology* 2006, **19(6)**:593-598.
14. Martin S, Clark R: **The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64(4)**:401-431.
15. Smith C, Rose G: **Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze.** *Behavioral neuroscience* 1997, **111(6)**:1197-1204.
16. McEwen B: **Stress and hippocampal plasticity.** *Annual review of neuroscience* 1999, **22**:105-22.
17. Selye H: **Stress – the physiology and pathology of exposure to systemic stress.** *Montreal: Acta Inc Med Publ* 1950.
18. Andersen M, Martins P, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S: **Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats.** *Journal of sleep research* 2005, **14**:83-90.
19. Cirelli C, Tononi G: **Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system.** *The Journal of neuroscience* 2000, **20(24)**:9187-9194.
20. Cirelli C, Tononi G: **The search for the molecular correlates of sleep and wakefulness.** *Sleep Medicine Reviews* 2001, **5(5)**:399-410.
21. Tononi G, Cirelli C: **Sleep function and synaptic homeostasis.** *Sleep medicine reviews* 2006, **10**:49-62.
22. Cirelli C, Tononi G: **Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle.** *Brain research* 2000, **885(2)**:303-321.
23. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger H: **Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis.** *Biochemical Journal* 1992, **281(Pt 1)**:21-40.
24. Kemp B, Mitchelhill K, Stapleton D, Michell B, Chen Z, Witters L: **Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase.** *Trends in biochemical sciences* 1999, **24**:22-25.
25. Hirst J: **Energy transduction by respiratory complex I—an evaluation of current knowledge.** *Biochemical Society Transactions* 2007, **33(Pt 3)**:525-529.
26. Ungermann C, Langosch D: **Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing.** *Journal of Cell Science* 2005, **118(Pt 17)**:3819-3828.
27. DerMardirossian C, Bokoch G: **GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation.** *Trends in Cell Biology* 2005, **15(7)**:356-363.
28. Seabra M, Wasmeier C: **Controlling the location and activation of Rab GTPases.** *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16(4)**:451-457.
29. Cirelli C, Gutierrez C, Tononi G: **Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression.** *Neuron* 2004, **41**:35-43.
30. Gruenberg J: **The endocytic pathway: a mosaic of domains.** *Nature reviews. Molecular cell biology* 2001, **2(10)**:721-730.
31. Fliegner K, Kaplan M, Wood T, Pintar J, Liem R: **Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system.** *The Journal of comparative neurology* 1994, **342(2)**:161-173.
32. Yi J, Pow D, Hazell A: **Early loss of the glutamate transporter splice-variant GLT-1v in rat cerebral cortex following lateral fluid-percussion injury.** *Glia* 2005, **49**:121-133.
33. Ding Q, Vaynman S, Souda P, Whitelegge J, Gomez-Pinilla F: **Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis.** *The European journal of neuroscience* 2006, **24(5)**:1265-1276.
34. Huber R, Tononi G, Cirelli C: **Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis.** *Sleep* 2007, **30(2)**:129-139.
35. Eng L, Ghimikar R, Lee Y: **Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000).** *Neurochemical research* 2000, **25(9-10)**:1439-1451.
36. Schroder N, de Mattos-Dutra A, Sampaio de Freitas M, Fogaca Lisboa C, Zilles A, Pessoa-Pureur R, Izquierdo I: **The effects of behavioral tasks on the in vitro phosphorylation of intermediate filament subunits of rat hippocampus are mediated by CaMKII and PKA.** *Brain Research* 1997, **749(2)**:275-282.
37. Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K: **Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, **1086**:116-125.
38. Charrier E, Reibel S, Rogemond V, Aguera M, Thomasset N, Honnorat J: **Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders.** *Molecular Neurobiology* 2003, **28**:51-64.
39. Gallia G, Johnson E, Khalili K: **Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein.** *Nucleic Acids Research* 2000, **28(17)**:3197-3205.
40. Sakai J, Ishikawa H, Kojima S, Satoh H, Yamamoto S, Kanaoka M: **Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis.** *Proteomics* 2003, **3(7)**:1318-1324.
41. Pastorelli R, Carpi D, Campagna R, Airolidi L, Pohjanvirta R, Viluksela M, Hakansson H, Boutros P, Moffat I, Okey A, Fanelli R: **Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance: correlation with genomic and transcriptomic analyses.** *Mol Cell Proteomics* 2006, **5(5)**:882-894.
42. Wilkinson B, Gilbert H: **Protein disulfide isomerase.** *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1699(1-2)**:35-44.
43. Weinshilboum RM: **Pharmacogenomics: catechol O-methyltransferase to thiopurine S-methyltransferase.** *Cell Mol Neurobiol* 2006, **26(4-6)**:539-561.
44. Hosono K, Sasaki T, Minoshima S, Shimizu N: **Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species.** *Gene* 2004, **340**:31-43.
45. Borbely A: **Effects of light on sleep and activity rhythms.** *Progress in neurobiology* 1978, **10**:1-31.
46. Tobler I, Franken P, Gao B, Jaggi K, Borbely A: **Sleep deprivation in the rat at different ambient temperatures: effect on sleep, EEG spectra and brain temperature.** *Archives italiennes de biologie* 1994, **132**:39-52.
47. Coenen A, van Luijtelaar E: **Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep.** *Physiol behav* 1985, **35(4)**:501-504.
48. Miller W: **Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2007, **1771(6)**:663-676.
49. McEwen B: **Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: Allostasis and allostatic load.** *Metabolism: clinical and experimental* 2006, **55(10 Suppl 2)**:S20-S23.
50. Sile S, Vanoye C, George A: **Molecular physiology of renal CIC chloride channels/transporters.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006, **15(5)**:511-516.

51. Borth W: **Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics.** *The FASEB Journal* 1992, **6(15)**:3345-3353.
52. Ribeiro S, Goyal V, Mello C, Pavlides C: **Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience.** *Learn Mem* 1999, **6(5)**:500-508.
53. Maquet P, Peigneux P, Laureys S, Boly M, Dang-Vu T, Desseilles M, Cleeremans A: **Memory processing during human sleep as assessed by functional neuroimaging.** *Rev Neurol (Paris)* 2003, **159(11 Suppl)**:6S27-6S29.
54. Franken P, Tobler I, Borbely A: **Sleep homeostasis in the rat: simulation of the time course of EEG slow-wave activity.** *Neuroscience Letters* 1991, **130(2)**:141-144.
55. Coenen A, van Hulzen Z, van Luijtelaar E: **Paradoxical sleep in the dark period of the rat: a dissociation between electrophysiological and behavioral characteristics.** *Behav Neural Biol* 1983, **37(2)**:350-356.
56. Poirrier J, Poirrier L, Leprince P, Maquet P: **Gemvid, an open source, modular, automated activity recording system for rats using digital video.** *Journal of Circadian Rhythms* 2006, **1(4)**:10.
57. Hortnagl H, Berger M, Sperk G, Pifl C: **Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus.** *Neuroscience* 1991, **45(2)**:261-272.
58. Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M: **Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.** *Proteomics* 2001, **1(3)**:377-396.
59. Marouga R, David S, Hawkins E: **The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology.** *Anal Bioanal Chem* 2005, **382(3)**:669-678.
60. Bohler S, Bagard M, Oufir M, Planchon S, Hoffmann L, Jolivet Y, Hausman J, Dizengremel P, Renaut J: **A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism.** *Proteomics* 2007, **7(10)**:1584-1599.
61. Perkins D, Pappin D, Creasy D, Cottrell J: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 1999, **20(18)**:3551-3567.
62. Pappin D, Hojrup P, Bleasby A: **Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting.** *Current biology* 1993, **3(6)**:327-332.

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

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

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

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

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



THÈSES SUPERVISÉES

Durant le doctorat, trois thèses ont été supervisées. Les sections suivantes présentent les résumés de chacun d'entre eux.

B.1 TÉLÉMÉTRIE DE SIGNAUX PHYSIOLOGIQUES RELATIFS AU SOMMEIL DU RAT

Travail de fin d'étude d'Ingénieur Civil Electricien effectué par Nicolas Marique en 2005, en collaboration avec le laboratoire de Micro-électronique et Microsystèmes du professeur J. Destiné (Université de Liège).

Ce travail de fin d'études s'inscrit dans le cadre d'une recherche biologique multidisciplinaire qui vise à étudier la consolidation de la mémoire spatiale chez le rat. Dans ce contexte, il faut pouvoir collecter et analyser en temps réel, durant plusieurs heures, différents signaux physiologiques caractéristiques : l'EEG et l'EMG. La télémétrie représente une solution attractive pour pallier les inconvénients des méthodes câblées utilisées jusqu'à présent. Cependant, les solutions télémétriques existantes ne permettent pas la transmission simultanée de plus de trois signaux. Le but de ce travail de fin d'études était de concevoir une chaîne d'acquisition capable de transmettre six canaux unipolaires : quatre EEG et deux EMG. La partie critique de celle-ci est le transmetteur. La solution proposée utilise un transmetteur composé d'amplificateurs et d'un multiplexeur analogique. Un signal composite constitué des six signaux électrophysiologiques et d'un signal de référence est modulé en fréquence avant d'être transmis. Il est réceptionné sur un récepteur FM radio commercial, avant son acquisition et sa digitalisation via l'entrée ligne de la carte son d'un ordinateur. La présence du signal de référence permet le démultiplexage du signal composite.

Deux prototypes successifs ont été construits pour compléter le travail théorique de conception et mener des tests de validation qui se sont avérés positifs. Des pistes d'amélioration pour la réalisation d'une carte de taille réduite sont proposées. Il n'a cependant pas été possible dans le cadre de ce travail d'aller jusqu'à la fabrication d'une unité miniaturisée.

B.2 TÉLÉMÉTRIE DE SIGNAUX PHYSIOLOGIQUES RELATIFS AU SOMMEIL DU RAT / 2

Travail de fin d'étude d'Ingénieur Civil Electricien effectué par Thibaut Libert en 2006, en collaboration avec le laboratoire de Microélectronique et Microsystèmes du professeur J. Destiné (Université de Liège).

Ce travail de fin d'études s'intègre dans une recherche biologique visant à étudier la consolidation de la mémoire spatiale chez le rat. L'acquisition et la transmission télémétrique de données physiologiques de l'animal, plus précisément l'électroencéphalogramme (EEG) et l'électromyogramme (EMG), pallie à de nombreux désavantages inhérents à la méthode câblée utilisée jusqu'à présent. Le but de ce travail est de développer une chaîne d'acquisition numérique permettant d'amplifier puis de transmettre au minimum quatre signaux physiologiques (2 EEG et 2 EMG) et de proposer une méthode d'analyse automatique capable de déterminer l'état de vigilance du rat.

Deux designs sont proposés. Le premier transmet jusqu'à 4 canaux bipolaires en utilisant un seul composant pour effectuer les opérations de numérisation, de mise en forme et de modulation. Le second, transmettant jusqu'à 8 canaux, utilise un convertisseur et un modulateur externes contrôlés par un micro-contrôleur. Les signaux sont émis à 433.92MHz en utilisant une modulation OOK (On-Off-Keying). Ils sont ensuite démodulés, décodés par un autre micro-contrôleur et transmis par protocole série vers un ordinateur permettant de visualiser le résultat ou vers une autre unité de traitement.

Différents montages sur *breadboard* et deux prototypes ont été construits afin de vérifier le bon fonctionnement des différents éléments de la chaîne. Un prototype de petite taille (2 cm sur 3,5cm) capable d'acquérir un EEG et un EMG a également été réalisé. Celui-ci n'a pas encore pu être utilisé sur un rat.

Une méthode d'analyse et de détection *online* des stades du sommeil, basée sur une décomposition en ondelettes, est proposée.

B.3 INFORMATISATION DE LA GESTION DU FONCTIONNEMENT D'UN LABORATOIRE DE RECHERCHE

Travail de fin d'étude de Gradué en Informatique effectué par Sébastien De Bruyne en 2006 (Ecole de Commerce et d'Informatique de la ville de Liège).

Le Centre de Recherches du Cyclotron de l'Université de Liège est le siège d'activités de recherches scientifiques diverses. Les domaines de prédilection sont la production de radionuclides, la recherche clinique en imagerie médicale et la recherche sur la chimie des traceurs biologiques.

Il comporte, en particulier, un laboratoire chargé de prélever et d'analyser les protéines synthétisées dans le cerveau de rats. Le laboratoire comporte donc une animalerie, où sont gardés les animaux.

Cette activité de recherche fondamentale a débuté il y a quatre ans. On y effectue des opérations chirurgicales sur rats, afin de préparer l'animal aux études postérieures, des exercices, avec ces mêmes rats dans une piscine (labyrinthe de Morris), puis des relevés électro-encéphalo-graphiques, pendant les phases d'éveil, de sommeil ou de rêves de l'animal (polysomnographie).

Tout cela se fait également dans le souci du bien être animal, l'animalerie assurant également les matières nécessaires à la vie quotidienne des rats (eau, nourriture, litière...)

Le projet qui nous occupe vise à informatiser la gestion de l'animalerie.

Actuellement, l'animalerie du Centre de Recherches du Cyclotron est gérée à l'aide de formulaires papiers. Tous les traitements subis par les rats ainsi que la description des étapes expérimentales et le détail pour chaque expérience sont notifiés sur papier. Le matériel physique utilisé dans le laboratoire, quant à lui, est régit par le LIMS (Laboratory Information Management System) et donc par l'Université elle-même.

Le but du projet est de répondre aux problèmes suivants :

- Gestion des stocks de matériel spécifique à l'animalerie (aucune interaction avec le LIMS existant n'est demandée.);
- Informatisation des formulaires : ils doivent être similaires à ceux existants sur papier, bien que certains champs peuvent être automatiquement pré-remplis ;
- Gestion des interactions entre formulaires ;
- Création automatique de statistiques quotidiennes ainsi que du rapport annuel.

Le client souhaite que notre application soit installée et opérationnelle sur le poste Linux, grâce à des outils libres, tels que le langage PHP et le système de gestion de base de données MySQL. C'est donc à l'aide de ces deux outils que nous travaillerons.

LOGICIELS DÉVELOPPÉS

Durant ce doctorat, quelques outils informatiques ont été développés. Les sections suivantes décrivent chacun de ces outils.

C.1 GEMVID

Voir détails à la section 4.

C.2 MARQUAGE DU COMPORTEMENT D'ACTIVITÉ

L'outil "Sleep Behaviour Scoring" (SBS) permet de marquer le comportement d'activité d'un rat dans son environnement par observation. Un certain nombre de comportements sont déjà présents (éveil, mange, gratte, explore, se déplace, se lave, se repose, dort, ...) et peuvent directement être utilisés lorsque le rat présente ce comportement. Des notes permettent d'indiquer d'autres comportements utiles à l'expérience. La liste des comportement ainsi marqués est sauvée et permet de quantifier la durée ainsi que la fréquence des différents comportements observés. La figure 32 montre une capture d'écran.

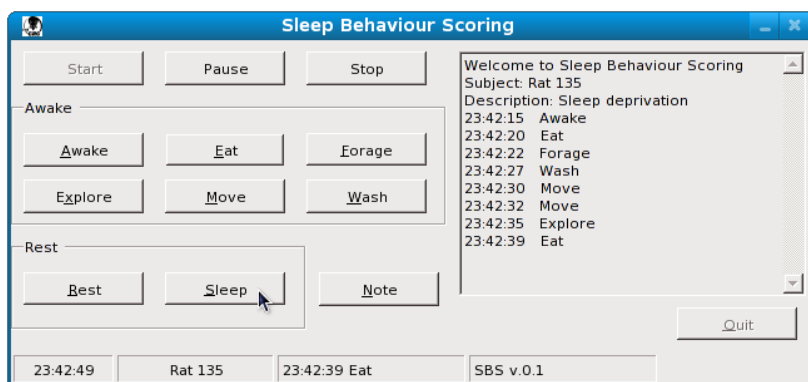


FIG. 32: Capture d'écran de SBS

- Fonctionne sous : MS-Windows
- Pré-requis : .Net installé (disponible gratuitement [ici](#)), version 2 ou supérieure
- License : [GNU General Public License](#)

C.3 ETHOVISION MISSING SAMPLES (EMS)

Lorsque notre logiciel de videotracking du labyrinthe de Morris n'arrive pas à déterminer la position de l'animal, ce dernier est considéré comme absent de l'image en question (échantillon manqué). La connaissance du nombre d'échantillons manqués est important lorsqu'on utilise des paramètres de mesures tels que la distance totale ou la vitesse moyenne. Ces paramètres sont biaisés de manière proportionnelle au nombre d'échantillons manqués. Ethovision ne permet pas de calculer directement ce nombre d'échantillons manqués.

L'outil "Ethovision Missing Samples" (EMS) calcule ce nombre sur base d'un export des tracés d'Ethovision. La figure 33 montre une capture d'écran. De plus amples informations ainsi que les sources et le logiciel sont disponibles [sur le site de Sourceforge](#).

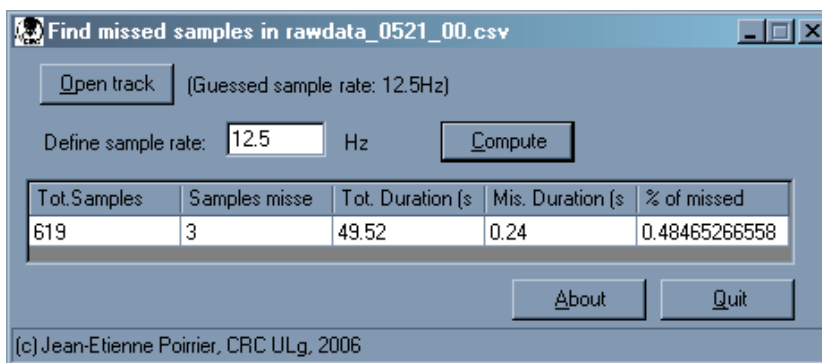


FIG. 33: Capture d'écran d'EMS

- Fonctionne sous : MS-Windows
- Pré-requis : .Net installé (disponible gratuitement [ici](#)), version 2 ou supérieure
- License : [GNU General Public License](#)

C.4 ETHOVISION PASTE TRACK (EPT)

L'outil EPT (Ethovision Paste Track) permet l'export aisé des tracés issus du videotracking d'animaux dans le labyrinthe de Morris. La figure 34 montre une capture d'écran. De plus amples informations ainsi que les sources et le logiciel sont disponibles [sur le site de Sourceforge](#).

- Fonctionne sous : MS-Windows
- Pré-requis : .Net installé (disponible gratuitement [ici](#)), version 2 ou supérieure
- License : [GNU General Public License](#)

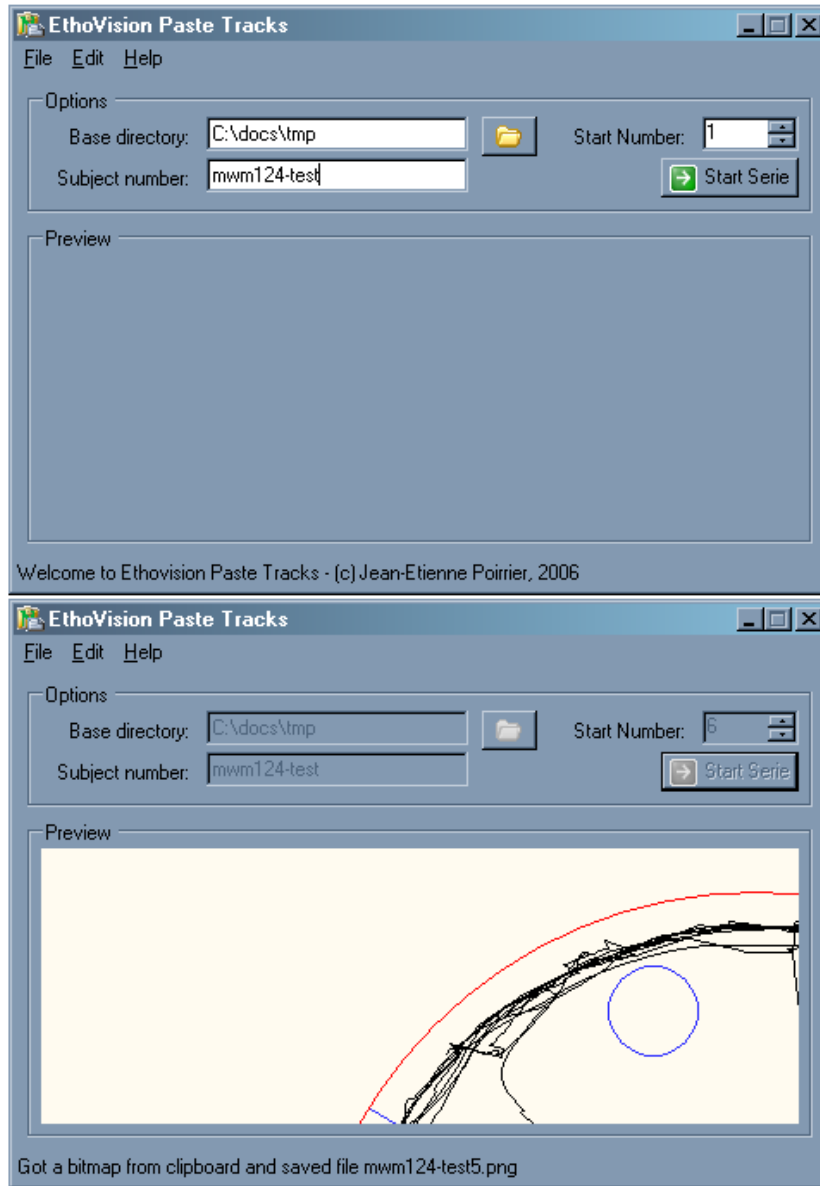


FIG. 34: Capture d'écran d'EPT

C.5 IPGPHOR 2 READER

L'IPGPhor est un appareil de focalisation iso-électrique des protéines de GE Healthcare. La version 2 de l'IPGphor peut être connectée à un ordinateur via un câble série. GE Healthcare fournit un logiciel de récolte des données de la focalisation mais pas de visualisation après focalisation. IPGPhor 2 Reader lit les logs de l'IPGPhor, affiche et sauve le graphe des différentes variables mesurées. La figure 35 montre une capture d'écran. De plus amples informations ainsi que les sources et le logiciel sont disponibles [sur le site de Sourceforge](#).

- Fonctionne sous : MS-Windows
- Pré-requis : .Net installé (disponible gratuitement [ici](#)), version 2 ou supérieure

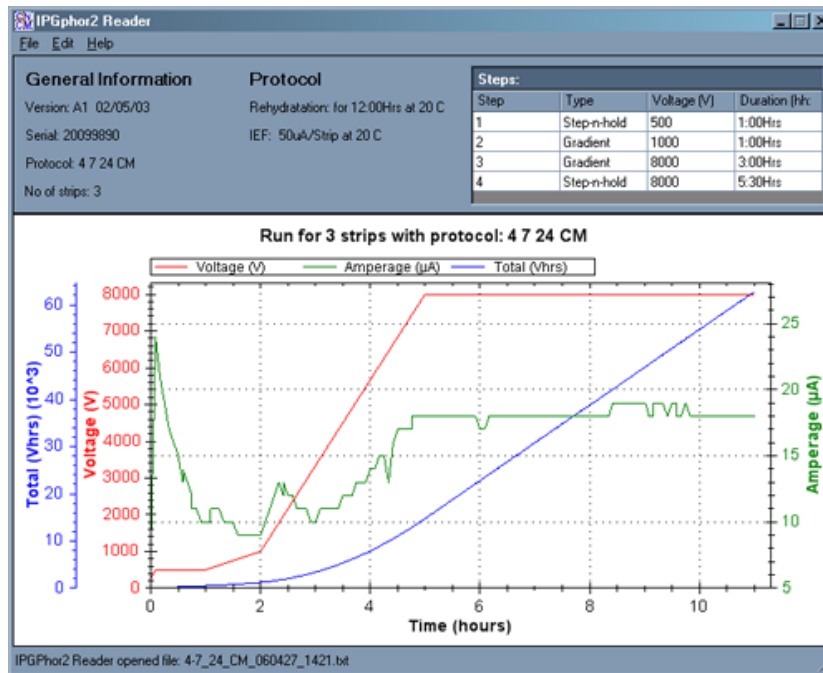


FIG. 35: Capture d'écran d'IPGPhor 2 Reader

- License : [GNU General Public License](#)

C.6 PICK LIST EDITOR

La liste des protéines d'intérêt à analyser par spectrométrie de masse est créée par le logiciel DeCyder (GE Healthcare). Cette liste inclut les coordonnées de chacun des spots qu'un robot de *picking* ira chercher. L'outil Pick List Editor permet d'éditer cette liste ainsi que d'inverser les coordonnées sur l'axe horizontal en fonction de la position du gel préparatif d'intérêt. La figure 36 montre une capture d'écran. De plus amples informations ainsi que les sources et le logiciel sont disponibles [sur le site de Sourceforge](#).

- Fonctionne sous : MS-Windows, MacOS, Linux
- Pré-requis : Java Runtime Engine installé (disponible gratuitement [ici](#)), version 6 ou supérieure
- License : [GNU General Public License](#)

C.7 JRASTERCREATOR

Les endroits où le laser de l'appareil de spectrométrie de masse Bruker Daltonics MS ultraflex II va exciter l'échantillon est défini dans des fichiers XML dont l'édition manuelle est difficile. JRasterCreator permet de visuellement créer et sauver ces fichiers pour les utiliser dans l'Ultraflex II. La figure 37 montre une capture d'écran. De plus amples

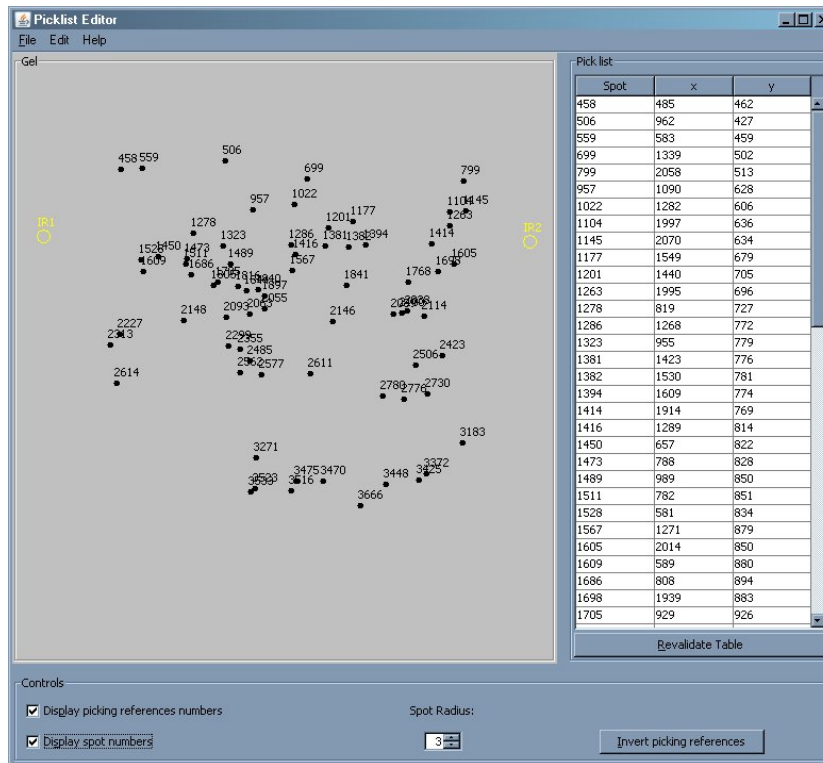


FIG. 36: Capture d'écran du Pick list editor

informations ainsi que les sources et le logiciel sont disponibles [sur le site de Sourceforge](#).

- Fonctionne sous : MS-Windows, MacOS, Linux
- Pré-requis : Java Runtime Engine installé (disponible gratuitement [ici](#)), version 6 ou supérieure
- License : [GNU General Public License](#)

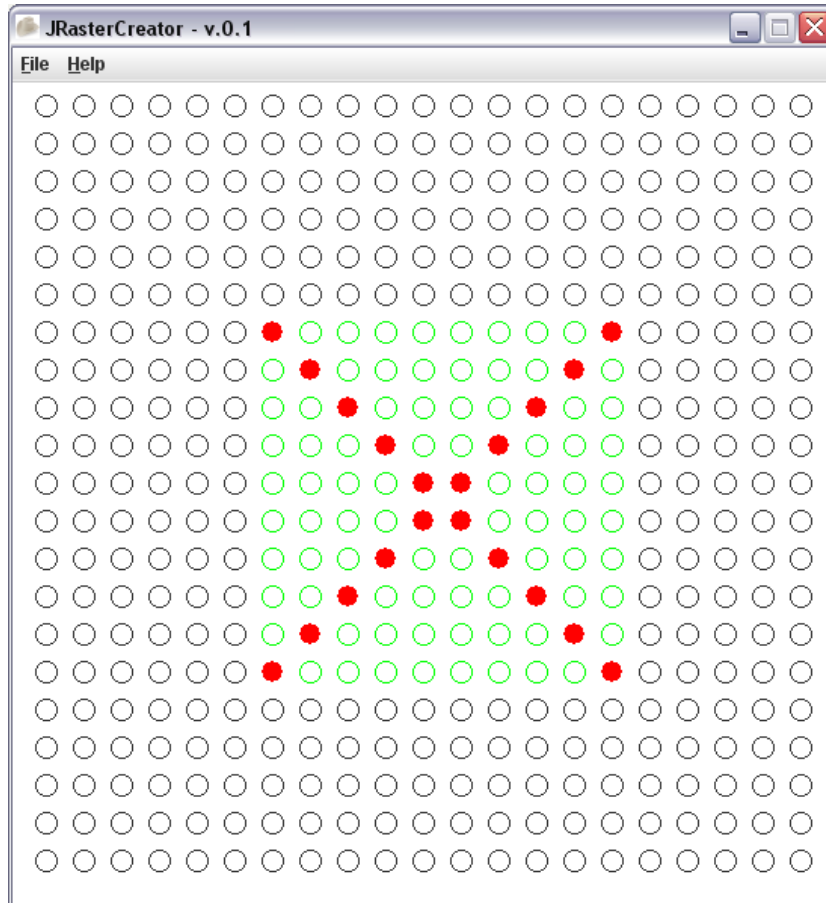


FIG. 37: Capture d'écran du JRasterCreator

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. Adam and I. Oswald. Sleep is for tissue restoration. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 11(4) :376–388, 1977. (Cité à la page 65.)
- [2] L. Afjehi-Sadat, J. W. Yang, A. Pollak, D. W. Kim, S. Y. Choi, and G. Lubec. Structural and functional analysis of hypothetical proteins in mouse hippocampus from two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 6(2) :711–723, 2007. (Cité à la page 38.)
- [3] C.M. Alberini. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological reviews*, 89(1) :121–145, 2009. (Cité à la page 5.)
- [4] P. Alfoldi, I. Tobler, and A.A. Borbely. The effect of light on sleep and the eeg of young rats. *Pflugers Archiv*, 417(4) :398–403, 1990. (Cité à la page 16.)
- [5] M.L. Andersen, P.J. Martins, V. D’Almeida, M. Bignotto, and S. Tufik. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *Journal of sleep research*, 14(1) :83–90, 2005. (Cité à la page 66.)
- [6] M.C. Antle and R.E. Mistlberger. Circadian rhythms. In *The behavior of the laboratory rat*, pages 183–194. Oxford University Press, 2005. (Cité aux pages 16, 17, et 18.)
- [7] N. Arimura, C. Menager, Y. Kawano, T. Yoshimura, S. Kawabata, A. Hattori, Y. Fukata, M. Amano, Y. Goshima, M. Inagaki, N. Morone, J. Usukura, and K. Kaibuchi. Phosphorylation by rho kinase regulates crmp-2 activity in growth cones. *Journal of molecular cell biology*, 25(22) :9973–9984, 2005. (Cité aux pages 100 et 102.)
- [8] S. Banks and D.F. Dinges. Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 3(5) : 519–528, 2007. (Cité à la page 2.)
- [9] R. Basheer, R. Brown, V. Ramesh, S. Begum, and R.W. McCarley. Sleep deprivation-induced protein changes in basal forebrain : implications for synaptic plasticity. *Journal of neuroscience research*, 82(5) :650–658, 2005. (Cité aux pages 65 et 74.)
- [10] I. Beaulieu and R. Godbout. Spatial learning on the morris water maze test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain and cognition*, 43(1–3) :27–31, 2000. (Cité aux pages 12 et 20.)

- [11] J. Beiko, R. Lander, E. Hampson, F. Boon, and D.P. Cain. Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behavioural brain research*, 151(1-2) :239–253, 2004. (Cité à la page 84.)
- [12] R.J. Beninger, T.A. Cooper, and E.J. Mazurski. Automating the measurement of locomotor activity. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 7(1) :79–85, 1985. (Cité à la page 51.)
- [13] J.H. Benington and M.G. Frank. Cellular and molecular connections between sleep and synaptic plasticity. *Progress in neurobiology*, 69(2) :71–101, 2003. (Cité à la page 3.)
- [14] J.H. Benington and H.C. Heller. Does the function of rem sleep concern non-rem sleep or waking? *Progress in neurobiology*, 44(5) :433–449, 1994. (Cité à la page 3.)
- [15] J.H. Benington and H.C. Heller. Implications of sleep deprivation experiments for our understanding of sleep homeostasis. *Sleep*, 22(8) :1033–1043, 1999. (Cité à la page 2.)
- [16] R.J. Berger and N.H. Phillips. Energy conservation and sleep. *Behavioural brain research*, 69(1–2) :65–73, 1995. (Cité aux pages 65, 78, et 79.)
- [17] B. Bjorvatn, S. Fagerland, and R. Ursin. Eeg power densities (0.5-20 hz) in different sleep-wake stages in rats. *Physiology & behavior*, 63(3) :413–417, 1998. (Cité à la page 17.)
- [18] S. Bohler, M. Bagard, M. Oufir, S. Planchon, L. Hoffmann, Y. Jolivet, J.F. Hausman, P. Dizengremel, and J. Renaut. A dige analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics*, 7(10) :1584–1599, 2007. (Cité à la page 33.)
- [19] A.A. Borbely. *Introduction*, chapter The Regulation of sleep, pages 17–25. Human Frontier Science Program, 2000. (Cité à la page 2.)
- [20] A.A. Borbely. Effects of light on sleep and activity rhythms. *Progress in neurobiology*, 10(1) :1–31, 1978. (Cité à la page 77.)
- [21] A.A. Borbely. A two process model of sleep regulation. *Human neurobiology*, 1(3) :195–204, 1982. (Cité à la page 96.)
- [22] J. Born, B. Rasch, and S. Gais. Sleep to remember. *Neuroscientist*, 12(5) :410–424, 2006. (Cité à la page 66.)
- [23] W. Borth. Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *The FASEB Journal*, 6(15) :3345–3353, 1992. (Cité à la page 79.)
- [24] A.M. Brown. Brain glycogen re-awakened. *Journal of neurochemistry*, 89(3) :537–552, 2004. (Cité à la page 2.)

- [25] R.W. Brown. Adolescence. In *The behavior of the laboratory rat*, pages 278–286. Oxford University Press, 2005. (Cité   la page 12.)
- [26] J. Bures, A.A. Fenton, Y. Kaminsky, and L. Zinyuk. Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1) :343–350, 1997. (Cité   la page 5.)
- [27] I.G. Campbell and I. Feinberg. Dissociation of delta eeg amplitude and incidence in rat nrem sleep. *Brain research bulletin*, 30(1-2) : 143–147, 1993. (Cité   la page 18.)
- [28] L. Carboni, C. Piubelli, P.G. Righetti, B. Jansson, and E. Domenici. Proteomic analysis of rat brain tissue : comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents. *Electrophoresis*, 23(24) :4132–4141, 2002. (Cité   la page 23.)
- [29] P. Carninci, T. Kasukawa, S. Katayama, J. Gough, M.C. Frith, N. Maeda, R. Oyama, T. Ravasi, B. Lenhard, C. Wells, R. Kodzius, K. Shimokawa, V.B. Bajic, S.E. Brenner, S. Batalov, A.R. Forrest, M. Zavolan, M.J. Davis, L.G. Wilming, V. Aidinis, J.E. Allen, A. Ambesi-Impiombato, R. Apweiler, R.N. Aturaliya, T.L. Bailey, M. Bansal, L. Baxter, K.W. Beisel, T. Bersano, H. Bono, A.M. Chalk, K.P. Chiu, V. Choudhary, A. Christoffels, D.R. Clutterbuck, M.L. Crowe, E. Dalla, B.P. Dalrymple, B. de Bono, G. Della Gatta, D. di Bernardo, T. Down, P. Engstrom, M. Fagiolini, G. Faulkner, C.F. Fletcher, T. Fukushima, M. Furuno, S. Futaki, M. Gariboldi, P. Georgii-Hemming, T.R. Gingeras, T. Gojobori, R.E. Green, S. Gustincich, M. Harbers, Y. Hayashi, T.K. Hensch, N. Hirokawa, D. Hill, L. Huminiecki, M. Iacono, K. Ikeo, A. Iwama, T. Ishikawa, M. Jakt, A. Kanapin, M. Katoh, Y. Kawasawa, J. Kelso, H. Kitamura, H. Kitano, G. Kollias, S.P. Krishnan, A. Kruger, S.K. Kummerfeld, I.V. Kurochkin, L.F. Lareau, D. Lazarevic, L. Lipovich, J. Liu, S. Liuni, S. McWilliam, M. Madan Babu, M. Madera, L. Marchionni, H. Matsuda, S. Matsuzawa, H. Miki, F. Mignone, S. Miyake, K. Morris, S. Mottagui-Tabar, N. Mulder, N. Nakano, H. Nakauchi, P. Ng, R. Nilsson, S. Nishiguchi, S. Nishikawa, F. Nori, O. Ohara, Y. Okazaki, V. Orlando, K.C. Pang, W.J. Pavan, G. Pavesi, G. Pesole, N. Petrovsky, S. Piazza, J. Reed, J.F. Reid, B.Z. Ring, M. Ringwald, B. Rost, Y. Ruan, S.L. Salzberg, A. Sandelin, C. Schneider, C. Schonbach, K. Sekiguchi, C.A. Semple, S. Seno, L. Sessa, Y. Sheng, Y. Shibata, H. Shimada, K. Shimada, D. Silva, B. Sinclair, S. Sperling, E. Stupka, K. Sugiura, R. Sultana, Y. Takenaka, K. Taki, K. Tammoja, S.L. Tan, S. Tang, M.S. Taylor, J. Tegner, S.A. Teichmann, H.R. Ueda, E. van Nimwegen, R. Verardo, C.L. Wei, K. Yagi, H. Yamanishi, E. Zabarovsky, S. Zhu, A. Zimmer, W. Hide, C. Bult, S.M. Grimmond, R.D. Teasdale, E.T. Liu, V. Brusica, J. Quackenbush, C. Wahlestedt, J.S. Mattick, D.A.

- Hume, C. Kai, D. Sasaki, Y. Tomaru, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, M. Suzuki, J. Aoki, T. Arakawa, J. Iida, K. Imamura, M. Itoh, T. Kato, H. Kawaji, N. Kawagashira, T. Kawashima, M. Kojima, S. Kondo, H. Konno, K. Nakano, N. Ninomiya, T. Nishio, M. Okada, C. Plessy, K. Shibata, T. Shiraki, S. Suzuki, M. Tagami, K. Waki, A. Watahiki, Y. Okamura-Oho, H. Suzuki, J. Kawai, and Y. Hayashizaki. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740) :1559–1563, 2005. (Cité à la page 43.)
- [30] V.D. Chamizo, R.D. Manteiga, T. Rodrigo, and N.J. Mackintosh. Competition between landmarks in spatial learning : the role of proximity to the goal. *Behavioural processes*, 71(1) :59–65, 2006. (Cité à la page 12.)
- [31] E. Charrier, S. Reibel, V. Rogemond, M. Aguera, N. Thomasset, and J. Honnorat. Collapsin response mediator proteins (crmps) : involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, 28(1) :51–64, 2003. (Cité à la page 76.)
- [32] L. Cipolotti and C.M. Bird. Amnesia and the hippocampus. *Current opinion in neurology*, 19(6) :593–58, 2006. (Cité à la page 66.)
- [33] C. Cirelli. Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. *Sleep medicine reviews*, 10(5) :307–321, 2006. (Cité aux pages 65, 73, 77, 101, et 103.)
- [34] C. Cirelli and G. Tononi. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *The Journal of neuroscience*, 20(24) :9187–9194, 2000. (Cité à la page 73.)
- [35] C. Cirelli and G. Tononi. Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain research*, 885(2) :303–321, 2000. (Cité aux pages 74 et 102.)
- [36] C. Cirelli and G. Tononi. The search for the molecular correlates of sleep and wakefulness. *Sleep Medicine Reviews*, 5(5) :399–410, 2001. (Cité aux pages 73, 101, et 104.)
- [37] C. Cirelli, C.M. Gutierrez, and G. Tononi. Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron*, 41(1) :35–43, 2004. (Cité aux pages 74 et 76.)
- [38] R.E. Clark and S.J. Martin. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Current opinion in neurobiology*, 15(5) :593–598, 2005. (Cité à la page 12.)

- [39] A.M. Coenen and E.L. van Luijtelaar. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiology and behavior*, 35(4) :501–504, 1985. (Cité à la page 77.)
- [40] A.M. Coenen, Z.J. van Hulzen, and E.L. van Luijtelaar. Paradoxical sleep in the dark period of the rat : a dissociation between electrophysiological and behavioral characteristics. *Behavioral and neural biology*, 37(2) :350–356, 1983. (Cité aux pages 18, 21, et 66.)
- [41] J.E. Coligan, B.M. Dunn, D.W. Speicher, and P.T. Wingfield. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2006. (Cité à la page 23.)
- [42] S. Commins, L. Cunningham, D. Harvey, and D. Walsh. Massed but not spaced training impairs spatial memory. *Behavioural brain research*, 139(1-2) :215–223, 2003. (Cité à la page 13.)
- [43] G. Copinschi. Metabolic and endocrine effects of sleep deprivation. *Essential psychopharmacology*, 6(6) :341–347, 2005. (Cité à la page 2.)
- [44] M. Costa-Mattioli, W.S. Sossin, E. Klann, and N. Sonenberg. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, 61(1) :10–26, 2009. (Cité aux pages 102 et 103.)
- [45] J. Crawley, C. Gerfen, M. Rogawski, D. Sibley, P. Skolnick, and S. Wray. *Current Protocols in Neuroscience*. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2005. (Cité à la page 11.)
- [46] F. Crick. Memory and molecular turnover. *Nature*, 312(5990) :101, 1984. (Cité à la page 3.)
- [47] T.T. Dang-Vu, M. Desseilles, P. Peigneux, and P. Maquet. A role for sleep in brain plasticity. *Pediatric rehabilitation*, 9(2) :98–118, 2006. (Cité à la page 65.)
- [48] H.P. Davis and L.R. Squire. Protein synthesis and memory : a review. *Psychological bulletin*, 96(3) :518–559, 1984. (Cité à la page 5.)
- [49] C. DerMardirossian and G.M. Bokoch. Gdis : central regulatory molecules in rho gtpase activation. *Trends in Cell Biology*, 15(7) :356–363, 2005. (Cité à la page 74.)
- [50] A.M. Deveney, A. Kjellstrom, T. Forsberg, and D.M. Jackson. A pharmacological validation of radiotelemetry in conscious, freely moving rats. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 40(2) :71–9, 1998. (Cité à la page 51.)
- [51] R. D’Hooge and P.P. De Deyn. Applications of the morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research reviews*, 36(1) :60–90, 2001. (Cité aux pages 97 et 99.)

- [52] M.C. Diamond, R.E. Johnson, D. Young, and S.S. Singh. Age-related morphologic differences in the rat cerebral cortex and hippocampus : male-female ; right-left. *Experimental neurology*, 81(1) :1–13, 1983. (Cité aux pages 37, 42, et 46.)
- [53] D.J. Dijk, D.G. Beersma, S. Daan, G.M. Bloem, and R.H. Van den Hoofdakker. Quantitative analysis of the effects of slow wave sleep deprivation during the first 3 h of sleep on subsequent eeg power density. *European archives of psychiatry and neurological sciences*, 236(6) :323–328, 1987. (Cité à la page 2.)
- [54] Q. Ding, S. Vaynman, P. Souda, J.P. Whitelegge, and F. Gomez-Pinilla. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *The European journal of neuroscience*, 24(5) :1265–1276, 2006. (Cité aux pages 38, 75, et 101.)
- [55] D.F. Dinges, F. Pack, K. Williams, K.A. Gillen, J.W. Powell, G.E. Ott, C. Aptowicz, and A.I. Pack. Cumulative sleepiness, mood disturbance, and psychomotor vigilance performance decrements during a week of sleep restricted to 4-5 hours per night. *Sleep*, 20(4) :267–277, 1997. (Cité à la page 3.)
- [56] H. Eichenbaum. *The Cognitive Neuroscience of Memory*. Oxford University Press, New York, USA, 2002. (Cité aux pages 4, 83, 101, et 103.)
- [57] L.F. Eng, R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee. Glial fibrillary acidic protein : Gfap-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25(9-10) :1439–11451, 2000. (Cité à la page 75.)
- [58] C.A. Everson. Sustained sleep deprivation impairs host defense. *The American journal of physiology*, 265(5 Pt 2) :R1148–R1154, 1993. (Cité à la page 65.)
- [59] K.H. Fliegner, M.P. Kaplan, T.L. Wood, J.E. Pintar, and R.K. Liem. Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 342(2) :161–173, 1994. (Cité aux pages 75 et 100.)
- [60] M. Fountoulakis and L. Suter. Proteomic analysis of the rat liver. *Journal of chromatography B*, 782(1-2) :197–218, 2002. (Cité à la page 39.)
- [61] M. Fountoulakis, E. Schuller, R. Hardmeier, P. Berndt, and G. Lubec. Rat brain proteins : two-dimensional protein database and variations in the expression level. *Electrophoresis*, 20(18) :3572–3579, 1999. (Cité aux pages 39 et 46.)

- [62] M. Fountoulakis, R. Hardmaier, E. Schuller, and G. Lubec. Differences in protein level between neonatal and adult brain. *Electrophoresis*, 21(3) :673–678, 2000. (Cité aux pages 39, 40, 46, et 49.)
- [63] M. Fountoulakis, J.F. Juranville, M. Dierssen, and G. Lubec. Proteomic analysis of the fetal brain. *Proteomics*, 2(11) :1547–1576, 2002. (Cité à la page 39.)
- [64] M. Fountoulakis, G.T. Tsangaris, A. Maris, and G. Lubec. The rat brain hippocampus proteome. *Journal of chromatography*, 819(1) : 115–129, 2005. (Cité à la page 38.)
- [65] M.G. Frank. The mystery of sleep function : current perspectives and future directions. *Reviews in the neurosciences*, 17(4) :375–392, 2006. (Cité aux pages 65, 78, et 79.)
- [66] P. Franken, I. Tobler, and A.A. Borbely. Sleep homeostasis in the rat : simulation of the time course of eeg slow-wave activity. *Neuroscience Letters*, 130(2) :141–144, 1991. (Cité à la page 66.)
- [67] P. Franken, C. Kopp, H.P. Landolt, and A. Luthi. The functions of sleep. *The European journal of neuroscience*, 29(9) :1739–1740, 2009. (Cité à la page 2.)
- [68] Y. Fukata, T.J. Itoh, T. Kimura, C. Menager, T. Nishimura, T. Shimizu, H. Watanabe, N. Inagaki, A. Iwamatsu, H. Hotani, and K. Kaibuchi. Crmp-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature cell biology*, 4(8) :583–591, 2002. (Cité à la page 100.)
- [69] G.L. Gallia, E.M. Johnson, and K. Khalili. Puralpha : a multifunctional single-stranded dna- and rna-binding protein. *Nucleic Acids Research*, 28(17) :3197–3205, 2000. (Cité à la page 76.)
- [70] J.E. Gangwisch, D. Malaspina, B. Boden-Albala, and S.B. Heymsfield. Inadequate sleep as a risk factor for obesity : analyses of the rhanes i. *Sleep*, 28(10) :1289–1296, 2006. (Cité à la page 2.)
- [71] R.L. Gibb. Environment. In *The behavior of the laboratory rat*, pages 321–331. Oxford University Press, 2005. (Cité aux pages 8 et 9.)
- [72] D.A. Golombek, G. Ortega, and D.P. Cardinali. Wheel running raises body temperature and changes the daily cycle in golden hamsters. *Physiology & behavior*, 53(6) :1049–1054, 1993. (Cité à la page 51.)
- [73] A. Gorg, G. Boguth, C. Obermaier, A. Posch, and W. Weiss. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized ph gradients in the first dimension (ipg-dalt) : the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*, 16(7) :1079–1086, 1995. (Cité aux pages 26 et 27.)

- [74] A. Gorg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, and Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21(6) : 1037–1053, 2000. (Cité aux pages 26 et 27.)
- [75] E. Gozal, D. Gozal, W.M. Pierce, V. Thongboonkerd, J.A. Scherzer, L.R. Sachleben, K.R. Brittan, S.Z. Guo, J. Cai, and J.B. Klein. Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. *Journal of neurochemistry*, 83(2) :331–345, 2002. (Cité à la page 38.)
- [76] G. Graham, R.S. Nairn, and G.W. Bates. Polyacrylamide gel staining with Fe^{2+} -bathophenanthroline sulfonate. *Analytical biochemistry*, 88(2) :434–441, 1978. (Cité à la page 28.)
- [77] L. Graves, A. Pack, and T. Abel. Sleep and memory : a molecular perspective. *Trends in neurosciences*, 24(4) :237–243, 2001. (Cité à la page 3.)
- [78] J. Gruenberg. The endocytic pathway : a mosaic of domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(10) :721–730, 2001. (Cité à la page 74.)
- [79] R. Gruetter. Glycogen : the forgotten cerebral energy store. *Journal of neuroscience research*, 74(2) :179–183, 2003. (Cité à la page 2.)
- [80] E.F. Hartree. Determination of protein : a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry*, 48(2) :422–427, 1972. (Cité à la page 23.)
- [81] T. Hashimoto, Y. Izawa, H. Yokoyama, T. Kato, and T. Morizumi. A new video/computer method to measure the amount of overall movement in experimental animals (two-dimensional object-difference method). *Journal of neuroscience methods*, 91(1–2) : 115–122, 1999. (Cité aux pages 51 et 61.)
- [82] J. Hirst. Energy transduction by respiratory complex i—an evaluation of current knowledge. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 3) :525–529, 2007. (Cité à la page 74.)
- [83] H. Hodges. Maze procedures : the radial-arm and water maze compared. *Brain research. Cognitive brain research*, 3(3-4) :167–181, 1996. (Cité à la page 13.)
- [84] H. Hortnagl, M.L. Berger, G. Sperk, and C. Piffl. Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 45(2) :261–272, 1991. (Cité aux pages 21 et 38.)
- [85] K. Hosono, T. Sasaki, S. Minoshima, and N. Shimizu. Identification and characterization of a novel gene family *ypel* in a wide

- spectrum of eukaryotic species. *Gene*, 340(1) :31–43, 2004. (Cité à la page 77.)
- [86] R. Huber, G. Tononi, and C. Cirelli. Exploratory behavior, cortical *bdnf* expression, and sleep homeostasis. *Sleep*, 30(2) :129–139, 2007. (Cité aux pages 75 et 101.)
- [87] C. Jud, I. Schmutz, G. Hampp, H. Oster, and U. Albrecht. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online*, 7 : 101–116, 2005. (Cité à la page 50.)
- [88] N. Kafkafi, C. Mayo, D. Drai, I. Golani, and G. Elmer. Natural segmentation of the locomotor behavior of drug-induced rats in a photobeam cage. *Journal of neuroscience methods*, 109(2) :111–121, 2001. (Cité à la page 51.)
- [89] S. Katayama, Y. Tomaru, T. Kasukawa, K. Waki, M. Nakanishi, M. Nakamura, H. Nishida, C.C. Yap, M. Suzuki, J. Kawai, H. Suzuki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. Wells, M. Frith, T. Ravasi, K.C. Pang, J. Hallinan, J. Mattick, D.A. Hume, L. Lipovich, S. Batalov, P.G. Engstrom, Y. Mizuno, M.A. Faghihi, A. Sandelin, A.M. Chalk, S. Mottagui-Tabar, Z. Liang, B. Lenhard, and C. Wahlestedt. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, 309 (5740) :1564–1566, 2005. (Cité à la page 43.)
- [90] B.E. Kemp, K.I. Mitchelhill, D. Stapleton, B.J. Michell, Z.P. Chen, and L.A. Witters. Dealing with energy demand : the amp-activated protein kinase. *Trends in biochemical sciences*, 24(1) : 22–25, 1999. (Cité à la page 74.)
- [91] K. Kito and T. Ito. Mass spectrometry-based approaches toward absolute quantitative proteomics. *Current genomics*, 9(4) :263–274, 2008. (Cité à la page 33.)
- [92] B. Kolb and I.Q. Whishaw. Brain plasticity and behavior. *Annual Review of Psychology*, 49 :43–64, 1998. (Cité à la page 83.)
- [93] P. Koteja, J.G. Swallow, P.A. Carter, and T. Garland. Different effects of intensity and duration of locomotor activity on circadian period. *Journal of biological rhythms*, 18(6) :491–501, 2003. (Cité à la page 50.)
- [94] N.P. LaMendola and T.G. Bever. Peripheral and cerebral asymmetries in the rat. *Science*, 278(5337) :483–486, 1997. (Cité à la page 37.)
- [95] P. Lescuyer, D.F. Hochstrasser, and J.C. Sanchez. Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation. *Electrophoresis*, 25(7–8) :1125–1135, 2004. (Cité à la page 22.)

- [96] Y Liu. Quantifying locomotor activity by computer video analysis. Master's thesis, Florida State University, August 2005. (Cité à la page 51.)
- [97] M.F. Lopez, K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson, and W.F. Patton. A comparison of silver stain and sypro ruby protein gel stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis*, 21(17) :3673–3683, 2000. (Cité à la page 29.)
- [98] R. Maex and V. Steuber. The first second : Models of short-term memory traces in the brain. *Neural networks*, 22(8) :1105–1112, 2009. (Cité à la page 4.)
- [99] A.P. Mahapatra, H.N. Mallick, and V.M. Kumar. Changes in sleep on chronic exposure to warm and cold ambient temperatures. *Physiology & behavior*, 84(2) :287–294, 2005. (Cité à la page 17.)
- [100] B.J. Manadas, K. Vougas, M. Fountoulakis, and C.B. Duarte. Sample sonication after trichloroacetic acid precipitation increases protein recovery from cultured hippocampal neurons, and improves resolution and reproducibility in two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(9) :1825–1831, 2006. (Cité à la page 23.)
- [101] P. Maquet. The role of sleep in learning and memory. *Science*, 294(5544) :1048–52, 2001. (Cité à la page 2.)
- [102] P. Maquet, P. Peigneux, S. Laureys, M. Boly, T. Dang-Vu, M. Desseilles, and A. Cleeremans. Memory processing during human sleep as assessed by functional neuroimaging. *Revue Neurologique*, 159(11 Suppl) :6S27–6S29, 2001. (Cité à la page 79.)
- [103] P. Maquet, C. Smith, and R. Stickgold, editors. *Sleep and brain plasticity*. Oxford University Press, Oxford, U.K., 2003. (Cité à la page 3.)
- [104] R. Marouga, S. David, and E. Hawkins. The development of the dige system : 2d fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382(3) :669–678, 2005. (Cité à la page 30.)
- [105] S.J. Martin and R.E. Clark. The rodent hippocampus and spatial memory : from synapses to systems. *Cellular and molecular life sciences*, 64(4) :401–431, 2007. (Cité à la page 66.)
- [106] B.S. McEwen. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor : Allostasis and allostatic load. *Metabolism : clinical and experimental*, 55(10 Suppl 2) :S20–S23, 2006. (Cité à la page 79.)
- [107] B.S. McEwen. Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience*, 22 :105–22, 1999. (Cité à la page 66.)

- [108] J.L. McGaugh. Memory—a century of consolidation. *Science*, 287 (5451) :248–251, 2000. (Cité à la page 83.)
- [109] D. McGinty and R. Szymusiak. Keeping cool : a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep. *Trends in neurosciences*, 13(12) :480–487, 1990. (Cité à la page 65.)
- [110] K. McNair, C.H. Davies, and S.R. Cobb. Plasticity-related regulation of the hippocampal proteome. *The European journal of neuroscience*, 23(2) :575–580, 2006. (Cité à la page 38.)
- [111] K. McNair, J. Broad, G. Riedel, C. H. Davies, and S. R. Cobb. Global changes in the hippocampal proteome following exposure to an enriched environment. *Neuroscience*, 145(2) :413–422, 2007. (Cité à la page 38.)
- [112] R. Medeiros, C. Lenneberg-Hoshino, K. Hoshino, and S. Tufik. Neuroethologic differences in sleep deprivation induced by the single-and multiple-platform methods. *Brazilian journal of medical and biological research*, 31(5) :675–680, 1998. (Cité à la page 20.)
- [113] W.B. Mendelson and B.M. Bergmann. Eeg delta power during sleep in young and old rats. *Neurobiology of aging*, 20(6) :669–673, 1999. (Cité à la page 20.)
- [114] W.L. Miller. Steroidogenic acute regulatory protein (star), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(6) :663–676, 2007. (Cité à la page 78.)
- [115] M.F. Moraes, C. Ferrarezi, F.J. Mont’Alverne, and N. Garcia-Cairasco. Low-cost automatic activity data recording system. *Brazilian journal of medical and biological research*, 30(8) :1009–1016, 1997. (Cité aux pages 50 et 51.)
- [116] R. Morris. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1) : 47–60, 1984. (Cité aux pages 11 et 12.)
- [117] J.R. Moskal, R.A. Kroes, N.J. Otto, O. Rahimi, and B.J. Claiborne. Distinct patterns of gene expression in the left and right hippocampal formation of developing rats. *Hippocampus*, 16(8) :629–634, 2006. (Cité aux pages 38 et 42.)
- [118] A. Murshid and J.F. Presley. Er-to-golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cellular and molecular life sciences*, 61 (2) :133–145, 2004. (Cité à la page 47.)
- [119] T. Niglio, M.G. Caporali, A. Scotti de Carolis, A. Ricci, and F. Amenta. Absence of right-left asymmetries in the rat hippocampus as demonstrated by timm staining. *Acta anatomica*, 139 (3) :283–286, 1990. (Cité aux pages 37 et 42.)

- [120] National Academy of Sciences, editor. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy Press, Washington, D.C., 1996. (Cité à la page 8.)
- [121] J. O'Keefe and J. Dostrovsky. The hippocampus as a spatial map. preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1) :171–175, 1971. (Cité aux pages 5 et 12.)
- [122] K.M. Olesen and A.P. Auger. Sex differences in fos protein expression in the neonatal rat brain. *Journal of neuroendocrinology*, 17(4) :255–261, 2005. (Cité à la page 46.)
- [123] I.A. Olsson and K. Dahlborn. Improving housing conditions for laboratory mice : a review of "environmental enrichment". *Lab Animal*, 36(3) :243–270, 2002. (Cité à la page 9.)
- [124] D.J. Pappin, P. Hojrup, and A.J. Bleasby. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology*, 3(6) : 327–332, 1993. (Cité aux pages 43, 70, 92, 94, et 95.)
- [125] V. Pasquali, E. Scannapieco, and P. Renzi. Validation of a microwave radar system for the monitoring of locomotor activity in mice. *Journal of circadian rhythms*, 4 :7, 2006. (Cité aux pages 50 et 51.)
- [126] R. Pastorelli, D. Carpi, R. Campagna, L. Airoidi, R. Pohjanvirta, M. Viluksela, H. Hakansson, P.C. Boutros, I.D. Moffat, A.B. Okey, and R. Fanelli. Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance : correlation with genomic and transcriptomic analyses. *Molecular & cellular proteomics*, 5(5) :882–894, 2006. (Cité à la page 76.)
- [127] E.G. Patterson-Kane, D.N. Harper, and M. Hunt. The cage preferences of laboratory rats. *Lab Animal*, 35(1) :74–79, 2001. (Cité aux pages 8 et 9.)
- [128] W.F. Patton. A thousand points of light : the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*, 21(6) :1123–1144, 2000. (Cité à la page 24.)
- [129] W.F. Patton. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of chromatography B*, 771(1–2) :3–31, 2002. (Cité à la page 24.)
- [130] D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18) : 3551–3567, 1999. (Cité aux pages 33 et 34.)
- [131] C.C. Petersen. The barrel cortex—integrating molecular, cellular and systems physiology. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 447(2) :126–134, 2003. (Cité à la page 37.)

- [132] G.L. Peterson. Determination of total protein. *Methods in enzymology*, 91 :95–119, 1983. (Cité à la page 23.)
- [133] J.J. Pilcher and A.I. Huffcutt. Effects of sleep deprivation on performance : a meta-analysis. *Sleep*, 19(4) :318–326, 1996. (Cité à la page 3.)
- [134] JE. Poirrier, L. Poirrier, P. Leprince, and P. Maquet. Gemvid, an open source, modular, automated activity recording system for rats using digital video. *Journal of Circadian Rhythms*, 1(4) :10, 2006. (Cité aux pages 21, 64, et 66.)
- [135] JE. Poirrier, F. Guillonneau, J. Renaut, K. Sergeant, A. Luxen, P. Maquet, and P. Leprince. Proteomic changes in rat hippocampus and adrenals following short-term sleep deprivation. *Proteome Science*, 6(1) :14, 2008. (Cité à la page 80.)
- [136] D.D. Pollak, T. Scharl, F. Leisch, K. Herkner, S.R. Villar, H. Hoeger, and G. Lubec. Strain-dependent regulation of plasticity-related proteins in the mouse hippocampus. *Behavioural brain research*, 165(2) :240–246, 2005. (Cité à la page 38.)
- [137] T. Porkka-Heiskanen. Gene expression during sleep, wakefulness and sleep deprivation. *Frontiers in bioscience*, 8 :s421–s437, 2003. (Cité à la page 65.)
- [138] C.C. Quinn, G.E. Gray, and S. Hockfield. A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *Journal of neurobiology*, 41(1) :158–164, 1999. (Cité à la page 100.)
- [139] L.P. Quinn, T.O. Stean, B. Trail, M.S. Duxon, S.C. Stratton, A. Billinton, and N. Upton. Laboras : Initial pharmacological validation of a system allowing continuous monitoring of laboratory rodent behaviour. *Journal of neuroscience methods*, 130(1) :83–92, 2003. (Cité à la page 51.)
- [140] R Development Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2007. ISBN 3-900051-07-0. (Cité à la page 55.)
- [141] T. Rabilloud, J.M. Strub, S. Luche, J.L. Girardet, A. van Dorsselaer, and J. Lunardi. Ruthenium ii tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis. *Proteome*, 1(1) :1–14, 2000. (Cité aux pages 28 et 29.)
- [142] T. Rabilloud, J.M. Strub, S. Luche, A. van Dorsselaer, and J. Lunardi. A comparison between sypro ruby and ruthenium ii tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*, 1(5) :699–704, 2001. (Cité aux pages 28 et 29.)

- [143] M.C. Ragbetli, A. Aydinlioglu, and S. Kaplan. Sex differences and right-left asymmetries in rat hippocampal components. *The International journal of neuroscience*, 112(1) :81–95, 2002. (Cité aux pages 37, 42, et 46.)
- [144] B. Raught and A.C. Gingras. eif4e activity is regulated at multiple levels. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(1) : 43–57, 1999. (Cité à la page 47.)
- [145] P. Ravassard, B. Pachoud, J.C. Comte, C. Mejia-Perez, C. Scoté-Blachon, N. Gay, B. Claustrat, M. Touret, P.H. Luppi, and P.A. Salin. Paradoxical (rem) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels, and erk/mapk activation in the dorsal hippocampus. *Sleep*, 32(2) :227–240, 2009. (Cité à la page 3.)
- [146] A. Rechtschaffen. Current perspectives on the function of sleep. *Perspectives in biology and medicine*, 41(3) :359–390, 1998. (Cité à la page 65.)
- [147] S. Ribeiro, V. Goyal, C.V. Mello, and C. Pavlides. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learning & Memory*, 6(5) :500–508, 1999. (Cité à la page 104.)
- [148] L.J. Rogers and R.J. Andrew. *Comparative vertebrate lateralization*. Cambridge University Press, 2002. (Cité à la page 36.)
- [149] A. Sadeh, P.J. Hauri, D.F. Kripke, and P. Lavie. The role of actigraphy in the evaluation of sleep disorders. *Sleep*, 18(4) : 288–302, 1995. (Cité à la page 51.)
- [150] J. Sakai, H. Ishikawa, S. Kojima, H. Satoh, S. Yamamoto, and M. Kanaoka. Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*, 3(7) :1318–1324, 2003. (Cité à la page 76.)
- [151] E. Save and B. Poucet. Piloting. In *The behavior of the laboratory rat*, pages 392–400. Oxford University Press, 2005. (Cité à la page 12.)
- [152] N. Schroder, A. de Mattos-Dutra, M. Sampaio de Freitas, C.S. Fogaca Lisboa, A.C. Zilles, R. Pessoa-Pureur, and I. Izquierdo. The effects of behavioral tasks on the in vitro phosphorylation of intermediate filament subunits of rat hippocampus are mediated by camkii and pka. *Brain Research*, 749(2) :275–282, 1997. (Cité à la page 75.)
- [153] D. Schulz, J.P. Huston, K. Jezek, H.L. Haas, A. Roth-Harer, O. Selbach, and H.J. Luhmann. Water maze performance, exploratory activity, inhibitory avoidance and hippocampal plasticity in aged

- superior and inferior learners. *European journal of neuroscience*, 16 (11) :2175–2185, 2002. (Cité à la page 99.)
- [154] M.C. Seabra and C. Wasmeier. Controlling the location and activation of rab gtpases. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4) : 451–457, 2005. (Cité à la page 74.)
- [155] H. Selye. *Stress - the physiology and pathology of exposure to systemic stress*. Acta Inc. Med. Publ., Montreal, 1950. (Cité à la page 66.)
- [156] J.M. Siegel. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*, 437(7063) :1264–1271, 2005. (Cité à la page 3.)
- [157] S. Sile, C.G. Vanoye, and A.L. George. Molecular physiology of renal clc chloride channels/transporters. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 15(5) :511–516, 2006. (Cité à la page 79.)
- [158] C.H. Sim, F.F. Gan, and T.C. Chang. Outlier labeling with boxplot procedures. *Journal of the American Statistical Association*, 100(470) : 642–652, 2005. (Cité à la page 85.)
- [159] C. Smith. Sleep states and memory processes. *Behavioural brain research*, 69(1–2) :137–145, 1995. (Cité aux pages 5 et 84.)
- [160] C. Smith. Sleep states, memory processes and synaptic plasticity. *Behavioural brain research*, 78 :49–56, 1996. (Cité aux pages 5 et 6.)
- [161] C. Smith and G.M. Rose. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the morris water maze. *Physiology & behavior*, 59(1) :93–97, 1996. (Cité à la page 5.)
- [162] C. Smith and G.M. Rose. Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the morris water maze. *Behavioral neuroscience*, 111(6) :1197–1204, 1997. (Cité aux pages 5, 6, 66, 84, 96, et 98.)
- [163] C. Smith, J. Young, and W. Yound. Prolonged increases in paradoxical sleep during and after avoidance-task acquisition. *Sleep*, 3(1) :67–81, 1980. (Cité aux pages 84 et 99.)
- [164] A.J. Spink, R.A. Tegelenbosch, M.O. Buma, and L.P. Noldus. The ethovision video tracking system—a tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Physiology & behavior*, 73(5) :731–744, 2001. (Cité à la page 13.)
- [165] G.F. Steinfels, G.A. Young, and N. Khazan. Diurnal variations in rem and nrem sleep eeg power spectra in the rat. *Behavioural brain research*, 181(2) :425–432, 1980. (Cité aux pages 17 et 18.)
- [166] R. Stickgold and M.P. Walker. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. *Sleep Medicine*, 8(4) :331–343, 2007. (Cité à la page 83.)

- [167] T. Sun, C. Patoine, A. Abu-Khalil, J. Visvader, E. Sum, T.J. Cherry, S.H. Orkin, D.H. Geschwind, and C.A. Walsh. Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science*, 308(5729) :1794–1798, 2005. (Cité à la page 38.)
- [168] G.R. Sutherland and B. McNaughton. Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(2) :180–186, 2000. (Cité à la page 83.)
- [169] M.H. Teicher, S.L. Andersen, P. Wallace, D.A. Klein, and J. Hostetter. Development of an affordable hi-resolution activity monitor system for laboratory animals. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 54(2) :479–483, 1996. (Cité à la page 51.)
- [170] C. Timo-Iaria, N. Negrao, W.R. Schmidek, K. Hoshino, C.E. Lobato de Menezes, and da Rocha Leme. Phases and states of sleep in the rat. *Physiology & behavior*, 5(9) :1057–1062, 1970. (Cité aux pages 16, 17, et 18.)
- [171] I. Tobler. Is sleep fundamentally different between mammalian species? *Behavioural brain research*, 69(1-2) :35–41, 1995. (Cité aux pages 2, 16, 17, 18, 19, et 20.)
- [172] I. Tobler, P. Franken, B. Gao, K. Jaggi, and A.A. Borbely. Sleep deprivation in the rat at different ambient temperatures : effect on sleep, eeg spectra and brain temperature. *Archives italiennes de biologie*, 132(1) :39–52, 1994. (Cité à la page 77.)
- [173] D.M. Togasaki, A. Hsu, M. Samant, B. Farzan, L.E. DeLanney, J.W. Langston, D.A. Di Monte, and M. Quik. The webcam system : a simple, automated, computer-based video system for quantitative measurement of movement in nonhuman primates. *Journal of neuroscience methods*, 145(1–2) :159–166, 2005. (Cité à la page 51.)
- [174] G. Tononi and C. Cirelli. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep medicine reviews*, 10(1) :49–62, 2006. (Cité aux pages 3, 73, 75, 79, et 101.)
- [175] E. Tulving, D.L. Schacter, D.R. McLachlan, and M. Moscovitch. Priming of semantic autobiographical knowledge : a case study of retrograde amnesia. *Brain and cognition*, 8(1) :3–20, 1988. (Cité à la page 4.)
- [176] C. Ungermann and D. Langosch. Functions of snares in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 17) :3819–3828, 2005. (Cité à la page 74.)
- [177] V.S. Valentinuzzi, L. Menna-Barreto, and G.F. Xavier. Effect of circadian phase on performance of rats in the morris water maze task. *Journal of biological rhythms*, 19(4) :312–324, 2004. (Cité aux pages 12 et 97.)

- [178] J.N. van Betteray, J.M. Vossen, and A.M. Coenen. Behavioural characteristics of sleep in rats under different light/dark conditions. *Physiology & behavior*, 50(1) :79–82, 1991. (Cité à la page 18.)
- [179] H.A. Van de Weerd, R.J. Bulthuis, A.F. Bergman, F. Schlingmann, J. Tolboom, P.L. Van Loo, R. Remie, V. Baumans, and L.F. Van Zutphen. Validation of a new system for the automatic registration of behaviour in mice and rats. *Behavioural processes*, 53(1–2) : 11–20, 2001. (Cité à la page 51.)
- [180] F.J. van der Staay. Effects of the size of the morris water tank on spatial discrimination learning in the cfw1 mouse. *Physiology & behavior*, 68(4) :599–602, 2000. (Cité à la page 97.)
- [181] P.L. Van Loo, H.A. Van de Weerd, L.F. Van Zutphen, and V. Baumans. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Animal*, 38 :178–188, 2004. (Cité aux pages 8 et 9.)
- [182] E.I. Varlinskaya, L.P. Spear, and N.E. Spear. Social behavior and social motivation in adolescent rats : role of housing conditions and partner's activity. *Physiology & behavior*, 67(4) :475–482, 1999. (Cité à la page 8.)
- [183] A. Veyrac, N. Giannetti, E. Charrier, I. Reymond-Marron, M. Aguera, V. Rogemond, J. Honnorat, and F. Jourdan. Expression of collapsin response mediator proteins 1, 2 and 5 is differentially regulated in newly generated and mature neurons of the adult olfactory system. *The European journal of neuroscience*, 21(10) : 2635–2648, 2005. (Cité à la page 100.)
- [184] A.N. Vgontzas, E. Zoumakis, E.O. Bixler, H.M. Lin, H. Follett, A. Kales, and G.P. Chrousos. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(5) :2119–2126, 2004. (Cité à la page 2.)
- [185] C.V. Vorhees, K.D. Acuff-Smith, D.R. Minck, and R.E. Butcher. A method for measuring locomotor behavior in rodents : contrast-sensitive computer-controlled video tracking activity assessment in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 14(1) :43–49, 1992. (Cité à la page 51.)
- [186] V. Vyazovskiy, A.A. Borbély, and I. Tobler. Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric eeg asymmetry during subsequent sleep in the rat. *Journal of sleep research*, 9(4) :367–371, 2000. (Cité à la page 37.)
- [187] K.U. Wagner, A. Krempler, Y. Qi, K. Park, M.D. Henry, A.A. Triplett, G. Riedlinger, E.B. Rucker III, and L. Hennighausen.

- Tsg101 is essential for cell growth, proliferation, and cell survival of embryonic and adult tissues. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1) :150–162, 2003. (Cité à la page 102.)
- [188] M.P. Walker. The role of sleep in cognition and emotion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1156 :168–197, 2009. (Cité à la page 3.)
- [189] M.P. Walker and R. Stickgold. Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron*, 44(1) :121–133, 2004. (Cité à la page 4.)
- [190] M.P. Walker and R. Stickgold. Sleep, memory, and plasticity. *Annual review of psychology*, 57 :139–166, 2006. (Cité aux pages 3, 65, et 83.)
- [191] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, and H.M. Eppenberger. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands : the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*, 281(Pt 1) :21–40, 1992. (Cité à la page 74.)
- [192] J.H. Wang, Buuse M. van den, S.W. Tian, and Y.Y. Ma. Effect of paradoxical sleep deprivation and stress on passive avoidance behavior. *Physiology & behavior*, 79(4–5) :591–596, 2003. (Cité à la page 20.)
- [193] R. M. Weinshilboum. Pharmacogenomics : catechol o-methyltransferase to thiopurine s-methyltransferase. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(4–6) :539–561, 2006. (Cité à la page 77.)
- [194] R. Weitzdorfer, H. Hoger, A. Pollak, and Lubec G. Changes of hippocampal protein levels during postnatal brain development in the rat. *Journal of Proteome Research*, 5(11) :3205–3212, 2006. (Cité à la page 46.)
- [195] R. Weitzdorfer, H. Hoger, K.S. Shim, L. Cekici, A. Pollak, and G. Lubec. Changes of hippocampal signaling protein levels during postnatal brain development in the rat. *Hippocampus*, 18(8) :807–813, 2008. (Cité aux pages 40 et 46.)
- [196] B. Wilkinson and H.F. Gilbert. Protein disulfide isomerase. *Biochimica et biophysica acta*, 1699(1-2) :35–44, 2004. (Cité à la page 76.)
- [197] W. Witting, M. Mirmiran, N.P. Bos, and D.F. Swaab. Effect of light intensity on diurnal sleep-wake distribution in young and old rats. *Brain research bulletin*, 30(1-2) :157–162, 1993. (Cité à la page 17.)

- [198] N. Yamada, K. Shimoda, K. Ohi, S. Takahashi, and K. Takahashi. Free-access to a running wheel shortens the period of free-running rhythm in blinded rats. *Physiology & behavior*, 42(1) : 87–91, 1988. (Cité à la page 51.)
- [199] J.H. Yi, D.V. Pow, and A.S. Hazell. Early loss of the glutamate transporter splice-variant *glt-1v* in rat cerebral cortex following lateral fluid-percussion injury. *Glia*, 49(1) :121–133, 2005. (Cité aux pages 75 et 101.)
- [200] T. Yoshimura, N. Arimura, and K. Kaibuchi. Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1086 :116–125, 2006. (Cité à la page 76.)

LICENSE

Copyright ©2010, Jean-Etienne Poirrier

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.3 or any later version published by the Free Software Foundation ; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts. A copy of the license can be found at <http://www.gnu.org/licenses/fdl-1.3-standalone.html>.

Final Version as of 16 janvier 2010 at 0:54.