

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
Faculté des Sciences de la Vie
- STRASBOURG -

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
NEUROSCIENCES

par

Benjamin Tournier

Rôle des gènes horloges
dans la traduction biologique de la photopériode par les
Noyaux Suprachiasmatiques et la *Pars tuberalis* des
mammifères.

Soutenance le 15 Septembre 2006, devant la commission d'examen :

Rapporteur Externe
Rapporteur Externe
Rapporteur Interne
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

Dr Benoît Malpaux
Dr François Rouyer
Pr Rémy Schlichter
Dr David Hazlerigg
Dr Paul Pévet
Dr Patrick Vuillez

Je tiens tout d'abord remercier le **Dr. Mireille Masson-Pévet** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Neurobiologie des Rythmes et le **Dr. Paul Pévet**, pour les discussions scientifiques et extra-scientifiques que nous avons pu avoir. Au cours de ces cinq années, j'aurai beaucoup appris à leur contact. Je les remercie également tous deux, pour le soutien qu'ils m'ont apporté au cours de ces derniers mois.

Je remercie vivement le **Dr. David Hazlerigg** pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire en Ecosse, pendant environ trois mois au cours de l'année 2004. A ces remerciements, j'associe également le **Dr. "Gaby" Wagner**, le **Dr. Jonathan Johnston** et **Jean-Michel Fustin**, doctorant. Leurs conseils scientifiques, nos discussions au laboratoire et ailleurs, m'ont été très utiles. Un *merci* plus particulier à Gaby et David pour m'avoir initié à la vie écossaise...

Je tiens aussi à remercier le **Pr. Rémy Schlichter**, le **Dr. Benoît Malpaux** et le **Dr. François Rouyer**, d'avoir accepté de juger ma thèse.

Je remercie également les personnes avec qui j'ai pu travailler au cours de ma thèse. Le **Dr. Valérie Simonneaux** pour notre étude chez le hamster d'Europe, le **Dr. Etienne Challet** pour l'étude concernant l'expression du gène *Tgfa*. De manière égale, je remercie le **Dr. Françoise Eclancher** pour les relectures de mon manuscrit et, les **Drs. André Malan, Paul Klosen** et **Jorge Mendoza** pour nos nombreuses discussions scientifiques.

Je tiens également à remercier les **Drs. Virginie Laurent-Gydé, Sylvie Raison** et **Berthe Vivien-Roels** pour leur amitié et pour nos diverses soirées passées ensemble. Bonne continuation à vous toutes !

Etant tous les jours au contact des *jeûnes* du labo, il m'est très difficile de résumer ces dernières années en quelques lignes...

Merci à "**Abou**", "**Dardente**", "**VJ**" et plus particulièrement à "**Skippy**" pour leur amitié et pour m'avoir initié aux différentes techniques. Merci à "**Valium**", "**Juju**" et "**Betty**", les encadrer (et plus encore) a été un véritable plaisir. Merci également à "**Maya**" d'avoir partagé avec moi ses bons petits plats, à "**Fiona**" et au "**Breton**", mes compagnons de piscine, à "**Docus**" pour nos nombreuses discussions autour d'un verre, et plus particulièrement à "**R2**", celle qui a été non seulement ma secrétaire, ma locatrice d'ordinateur mais aussi ma bargirl le dimanche soir...

Et pour toutes les autres soirées, merci encore à **Annika Herwig**, "**Coco**", "**Shrek**", "**TGM**" et à "**Wizard**". Merci également aux plus *jeûnes* d'entre nous, les "**Deux blondes**", "**Le Bleu**" et "**Le Petit**", bon courage à vous tous.

Enfin, à celui qui a été mon colocataire puis mon voisin du dessous, mon voisin de paille et mon conseiller au labo, mon compagnon de diverses démarches pour les doctorants de l'IFR, tout simplement, Merci "**Requin**" ! Et au-delà de ces quelques lignes, chacun d'entre nous saura en garder des sentiments d'amitié sincère.

Merci enfin à toutes les personnes du laboratoire, notamment à **Fafa, Aurore, Daniel B** et **Daniel C** pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Comme une thèse ne peut se réaliser dans les meilleures conditions qu'avec le soutien et l'amitié de personnes en dehors du laboratoire, je veux remercier tout particulièrement **mes parents, ma sœur** et **mon frangin**. Merci aussi aux *Grepsy* et assimilés dont "**Le Blond**", "**Dagus**", "**Nini**", et **Steeve**...

On aurait pu croire que cela allait s'arrêter là?? Comment ne pas remercier la personne sans qui, rien de ce travail n'aurait pu aboutir ? Comment ne pas déjà regretter de ne plus *partager le même bureau* et tout ce que cela engendre ? En clair, comment faire pour remercier à son juste titre, mon directeur de thèse qui, plus qu'un directeur, est un ami. Comment faire donc pour remercier **Pat'** ?

Un bon début serait de résumer en quelques mots, ces cinq dernières années... Tout à commencé lorsqu'il m'a accepté dans son groupe pour étudier les effets d'une diminution de photopériode sur la transcription des gènes de l'horloge. Le premier contact fut déjà placé sous le signe de l'amitié après un bref entretien...de presque deux heures. C'est là qu'il est devenu officiellement mon "chef".

Par la suite et au cours de ces cinq années, il a réussi à être, en fonction de ma propre humeur (..) à la fois un chef pour son encadrement, un grand frère pour tous ses conseils concernant l'enseignement et un ami pour sa patience, son ouverture d'esprit et ses conseils judicieux sur le plan professionnel comme personnel...

Ces quelques lignes ne sont qu'un pâle reflet de toute la reconnaissance que j'ai pour lui...

Merci Chef !

Abou : Dr. Sandrine Siffroi-Fernandez
Betty : Elisabeth Waltisperger
Breton : Dr. Laurent Tritschler
Coco : Corina Bobu
Dardente : Dr. Hugues Dardente
Deux blondes : Aurélie Bègle & Domitille
Boudard
Docus : Céline Feillet
Fiona : Emeline Umbrecht-Jenk
Juju : Julien Guy
Le Bleu : Marc Cuesta

Le Petit : Laurent Nexon
Maya : Zeïna Malek
R2 : Laurence Agez
Requin : Dr. Florent Revel
Shrek : Anthony Salingre
Skippy : Dr. Jérôme Menet
TGM : Mathieu Chansard
Valium : Jérôme Birkenstock
VJ : Dr. Vincent-Joseph Poirel
Wizard : Dr. Caroline Graff

SOMMAIRE

Liste des abréviations récurrentes 7

A. INTRODUCTION 9

1. Le système circadien	15
1.1. INTERET D'UN SYSTEME CIRCADIEN	15
1.2. UNE HORLOGE... DANS LE CERVEAU.....	15
1.2.1. <i>Evidences expérimentales.</i>	15
1.2.2. <i>Subdivisions histochimiques des SCN.</i>	17
1.2.3. <i>Activité électrique des neurones des SCN.</i>	19
1.2.4. <i>Un couplage nécessaire à la construction d'un message rythmique.</i>	20
1.2.5. <i>Subdivisions histochimiques...et fonctionnelles des SCN ?</i>	22
1.2.6. <i>L'afférence photique majeure des SCN</i>	23
1.2.6.1. Anatomie et neurotransmetteurs impliqués.....	23
1.2.6.2. Les photorécepteurs rétiniens.....	23
1.2.7. <i>Distribution des messages rythmiques efférents aux SCN</i>	25
1.2.7.1. Voies Nerveuses puis endocrines.....	27
1.2.7.2. Des facteurs diffusibles	30
1.2.8. <i>Conclusion</i>	32
1.3. FONCTIONNEMENT MOLECULAIRE DE L'HORLOGE	34
1.3.1. <i>L'horloge moléculaire</i>	34
1.3.1.1. Les gènes horloges	34
1.3.1.2. Les gènes contrôlés par l'horloge.....	43
1.3.1.3. Gènes horloges, activité électrique, VIP & AVP	43
1.3.2. <i>Des niveaux de régulations</i>	48
1.3.2.1. Régulation Transcriptionnelle	48
1.3.2.2. Régulation Post-transcriptionnelle	57
1.3.2.3. Régulation Traductionnelle	59
1.3.2.4. Régulation Post-traductionnelle	60
1.3.2.5. Conclusions des régulations	70
1.4. SYNCHRONISATION DE L'HORLOGE PRINCIPALE.....	76
1.4.1. <i>Au niveau physiologique</i>	76
1.4.2. <i>Au niveau cellulaire</i>	76
1.4.3. <i>Au niveau moléculaire</i>	79
1.5. DES HORLOGES... EN PERIPHERIE	86
1.5.1. <i>Des oscillateurs périphériques</i>	86
1.5.2. <i>Un chef d'orchestre ?</i>	92
1.5.3. <i>Exemple d'une relation horloge moléculaire-fonction</i>	96
1.5.3.1. Peroxisome Proliferator-activated Receptor α	96
1.5.3.2. Gènes horloges et PPAR α	98

2.	Le système saisonnier.....	101
2.1.	INTERET DU SYSTEME SAISONNIER.....	101
2.2.	ROLE DE LA PHOTOPERIODE.....	102
2.2.1.	<i>La physiologie au cours des saisons.....</i>	<i>102</i>
2.2.1.1.	Photopériode critique.....	102
2.2.1.2.	Photopériode réfractaire.....	104
2.2.2.	<i>Des modèles pour expliquer la mesure du temps.....</i>	<i>105</i>
2.2.2.1.	Le modèle de coïncidence externe.....	105
2.2.2.2.	Le modèle de coïncidence interne.....	107
2.2.3.	<i>L'horloge principale au cours de saisons.....</i>	<i>109</i>
2.3.	UNE HORMONE... DONNEUSE DE TEMPS.....	110
2.3.1.	<i>Synthèse de la mélatonine et variations circadiennes & saisonnières.....</i>	<i>110</i>
2.3.2.	<i>La mélatonine et ses récepteurs.....</i>	<i>112</i>
2.3.2.1.	Cibles de la mélatonine.....	112
2.3.2.2.	Les récepteurs MT1 et MT2.....	113
2.3.3.	<i>Effets de la mélatonine.....</i>	<i>114</i>
2.3.3.1.	Circadiens.....	114
2.3.3.2.	Saisonniers.....	119
2.4.	LA PARS TUBERALIS.....	122
2.4.1.	<i>Expression génique.....</i>	<i>122</i>
2.4.2.	<i>Contrôle de la libération de PRL.....</i>	<i>124</i>
2.4.3.	<i>Gènes horloges et...régulation par la mélatonine.....</i>	<i>125</i>
2.4.3.1.	Expression des gènes horloges.....	125
2.4.3.2.	Contrôle de l'expression des gènes horloges.....	126
2.4.3.3.	Modèle de coïncidence interne.....	128
2.5.	PHOTOPERIODE REFRACTAIRE.....	133
2.6.	UNE HORLOGE SAISONNIERE.....	136
2.6.1.	<i>Une contrainte majeure.....</i>	<i>136</i>
2.6.2.	<i>Mise en évidence physiologiques et caractéristiques.....</i>	<i>136</i>
2.6.3.	<i>Quelques limites.....</i>	<i>138</i>
2.6.4.	<i>Localisation de cette horloge.....</i>	<i>138</i>
2.6.5.	<i>Un rôle pour la PT ?.....</i>	<i>139</i>
2.6.6.	<i>Conclusions.....</i>	<i>139</i>

B. OBJECTIFS **141**

C. MATERIELS & METHODES **145**

1.	Animaux et prélèvements	147
1.1.	CONDITIONS D'ELEVAGE.....	147
1.2.	PRELEVEMENTS.....	149
2.	Hybridation <i>in situ</i> radioactive	151

2.1.	TECHNIQUE 1	151
2.1.1.	<i>Clonage et synthèse des sondes</i>	151
2.1.2.	<i>Hybridation</i>	154
2.2.	TECHNIQUE 2	158
2.2.1.	<i>Synthèse des sondes</i>	158
2.2.2.	<i>Hybridation</i>	158
3.	Dosages radioimmunologiques	160
4.	Statistiques et Modélisations mathématiques	161
4.1.	ANALYSE DE LA VARIANCE.....	161
4.2.	REGRESSIONS NON LINEAIRES.....	161
4.2.1.	<i>Analyse du cosinor</i>	162
4.2.2.	<i>Equation à un ou deux pics logistiques</i>	162
4.2.2.1.	Equation à un pic logistique.....	162
4.2.2.2.	Equation à deux pics logistiques.....	163

D. RESULTATS & DISCUSSIONS

165

1.	Influence de la photopériode sur le fonctionnement nyctéméral de l'horloge circadienne	167
1.1.	CHEZ LE HAMSTER SYRIEN.....	167
1.1.1.	<i>Introduction</i>	167
1.1.2.	<i>Résultats</i>	167
1.1.3.	<i>Discussion</i>	170
1.2.	CHEZ LE HAMSTER D'EUROPE.....	174
1.2.1.	<i>Introduction</i>	174
1.2.2.	<i>Résultats</i>	175
1.2.3.	<i>Discussion</i>	179
2.	Mécanismes d'intégration de la photopériode par les gènes de l'Horloge	182
2.1.	EFFETS D'UN CHANGEMENT DE PHOTOPERIODE.....	182
2.1.1.	<i>Introduction</i>	182
2.1.2.	<i>Résultats</i>	183
2.1.2.1.	Effet direct de la photopériode.....	183
2.1.2.2.	La photopériode courte réfractaire.....	187
2.1.2.3.	<i>Clock "au cours des saisons"</i>	187
2.1.3.	<i>Discussion</i>	190
2.2.	ROLE DE LA MELATONINE SUR LES SCN.....	194
2.2.1.	<i>Introduction</i>	194
2.2.2.	<i>Résultats</i>	194
2.2.3.	<i>Discussion</i>	197
3.	Contrôle de l'activité locomotrice par le TGFα	199
3.1.	INTRODUCTION.....	199
3.2.	RESULTATS.....	200

3.2.1.	<i>Expressions journalière et circadienne de l'Avp, du Vip et du Grp.</i>	200
3.2.2.	<i>Expressions journalière et circadienne du Tgfa.</i>	204
3.3.	DISCUSSION.	210
4.	Mécanisme de décodage du signal mélatoninergique par la <i>Pars tuberalis</i>.	214
4.1.	CHEZ LE HAMSTER D'EUROPE	214
4.1.1.	<i>Introduction</i>	214
4.1.2.	<i>Résultats</i>	215
4.1.3.	<i>Discussion</i>	218
4.2.	CHEZ LE MOUTON.	219
4.2.1.	<i>Introduction</i>	219
4.2.2.	<i>Résultats</i>	220
4.2.3.	<i>Discussion</i>	224

E. CONCLUSIONS & PERSPECTIVES **227**

1.	Du circadien au saisonnier.	231
1.1.	CODAGE DE LA PHOTOPERIODE PAR LES SCN	231
1.1.1.	<i>Au niveau moléculaire.</i>	231
1.1.2.	<i>Au niveau cellulaire.</i>	232
1.2.	CONCLUSIONS.	233
2.	<i>Clock</i>, un gène à la base des rythmes saisonniers.	235
2.1.	REGULATION DE LA PRESENCE DES ARNm DE CLOCK.	235
2.2.	CONSEQUENCES DE CETTE ADAPTATION.	236
3.	<i>La Pars tuberalis</i>, un modèle d'études...	238
3.1.	MODELE DE COÏNCIDENCE INTERNE.	238
3.2.	MODELE D'HORLOGES MOLECULAIRES.	240

F. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **245**

G. ANNEXES **285**

Liste des Abréviations récurrentes

AA-NAT : Aryl-acrylamine N-acétyl transferase	LP-R : photopériode longue réfractaire
Apo : Apolipoprotéine	M : Morning
ANOVA : Analyse de la variance	MAPK : Mitogen-activated protein kinase
αODN : α Oligodéoxynucléotides	NONO : Non-POU-domain-containing, octamer-binding protein
AP-1 : Activator protein 1	NPY : Neuropeptide Y
AVP : Arginine vasopressin	PAR : Proline and acidic amino acid rich
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor	PAS : Period-Arnt-sim
bHLH : basic helix loop helix	Per : Period
BIT : Brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs	<i>Per1::LUC</i> : rapporteur luciférase couplé au promoteur de <i>Per1</i> .
Bmal1 : Brain and muscle ARN-t like protein 1	<i>PER2::LUC</i> : protéine de fusion réalisée à partir des 23 exons de la séquence codant PER2, auxquels sont ajoutés la séquence codant la LUC
β-TrCP : β -Transducin repeat containing protein	Pk2 : Prokineticin 2
CALB : Calbindin	PK_{A/G} : Protéine kinase dépendante du cA/GMP
CaMKII : Ca ⁺⁺ /Calmoduline kinase II	PP2A/B : protein phosphatase 2A/B
CBP : CREB binding protein	PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
CCD : Computer-controlled digital video	PPREs : Peroxisome proliferator-activated receptor response element
CCG : clock-controlled gene	PRC : Courbe de réponse de phase
CHX : cycloheximide	PRL : prolactine
CKI_{ϵ/δ} : Caséine kinase I _{ϵ/δ}	PT : Pars tuberalis
Clock : Circadian locomotor output cycles kaput	RAR : Retinoic acid receptor
CRE : cAMP Response Element	RBP : RNA-binding protein
CREB : CRE binding protein	RHT : Tractus rétinohypothalamique
Cry : cryptochrome	ROREs : REV-ERB α / ROR Response element
Dbp : Albumin gene D-site binding protein	RORs : Retinoic acid-related orphan receptor
DD : Dark-Dark	RSK-1/2 : Ribosomal protein S6 kinase-1/2
DEXRAS1 : Dexamethasone-induced RAS protein 1	RXR : Retinoid X receptor α
DHP : Déconnection hypothalamo-pituitaire	RZRβ : Retinoid Z receptor β
DR : Direct Repeat	SCN : Noyaux suprachiasmatiques
E : Evening	SiRNA : Small interfering RNA
EGF : Epidermal growth factor	SP : photopériode courte
EGFR : EGF receptor 1	SP1 : Specificity protein 1
ErbB : Famille des récepteurs à tyrosine kinase	SP-R : Photopériode courte réfractaire
ExtT : External Time	SPVZ : Zone subparaventriculaire
F : Flash	SUMO : Small ubiquitin-related modifier protein
GRP : Gastrin releasing peptide	TGFα : Transforming growth factor α
GSK3 : Glycogen synthase kinase-3	TTX : Tétrodotoxine
HATs : histones acétyltransférases	UTR 3/5' : Untranslated region 3/5'
HDAC1/2/3 : Histones déacétylases	VIP : Vasoactive intestinal peptide
ICV : Intracérébroventriculaire	WDR5 : WD40-repeat protein 5
IEG : Immediated early genes	ZT : Zeitgeber Time
LUC : luciférase	
LD : Light-Dark	
LL : lumière constante	
LP : photopériode longue	

A. Introduction

Dans la nature, l'ouverture des feuilles de l'églantier (*Rosa canina*) est en phase avec le lever du soleil, à l'opposé de celle des fleurs du silène penché (*Silene nutans*) s'ouvrant avec la tombée du jour. La buse variable (*Buteo buteo*) chasse pendant le jour et se repose pendant la nuit tandis que la chouette effraie (*Tyto alba*) présente à l'inverse une activité nocturne et un repos diurne. L'hellébore fétide (*Helleborus foetidus*) débute sa période de floraison en janvier tandis que l'iris des marais (*Iris pseudacorus*) doit attendre le mois de mai pour fleurir. Le départ, dès la fin de l'été, de quelques milliards d'insectes et d'oiseaux, notamment la libellule sympétrum strié (*Sympetrum striolatum*), le papillon vulcain (*Vanessa atalanta*) et l'hirondelle rustique (*Hirundo rustica*) à partir de l'Europe et en direction de contrées plus chaudes, se répète d'année en année. La reproduction du putois (*Mustela putorius putorius*) et de la truite commune (*Salmo trutta*) s'effectue à un moment bien déterminé dans l'année, en mars et en novembre, respectivement. Voici quelques exemples, tant au niveau du règne végétal que du règne animal, des nombreux événements s'effectuant de manière répétée à l'identique au cours du temps. Ces rythmes ont une périodicité proche de la durée soit d'un jour, soit d'un an. A première vue, ces différents rythmes semblent suivre passivement le monde extérieur...

En ce qui concerne les rythmes journaliers, il est maintenant clairement établi que ces différents comportements sont construits activement par l'organisme, qui contient alors une horloge interne. En plaçant des rongeurs dans des cages individuelles permettant un accès à une roue, l'enregistrement de l'activité locomotrice peut-être effectué par comptage du nombre de tours de roue, par tranche de dix ou quinze minutes. Si les animaux sont placés en conditions environnementales constantes comme, par exemple, en nuit constante (DD, "Dark-Dark"), on remarque que le rythme d'activité locomotrice persiste comme le montre les actogrammes [figure 1](#), pour l'exemple d'un rongeur nocturne, et d'un rongeur diurne. Le rythme d'activité locomotrice s'exprimant en conditions constantes, sans influence du monde extérieur, est dit **endogène**. En suivant jour après jour l'heure de début d'activité, on peut calculer la période de ce rythme. Dans le cas de la souris comme dans celui de *A. ansorgei*, cette période est proche de 24 heures, sans être exactement égale à 24 heures. Ce rythme est alors qualifié de **circadien** (du latin: *circa*, proche de; et *dies*, jour). Ainsi, les 24 heures circadiennes sont divisées en **jour subjectif** (correspondant à la phase d'activité chez les organismes diurnes et à celle de repos chez les nocturnes) et en **nuit subjective** (phase d'activité des nocturnes et de repos des diurnes). Si les animaux sont placés en conditions d'alternance jour/nuit LD12:12 ("Light-Dark12:12", 12 heures de lumière et 12 heures

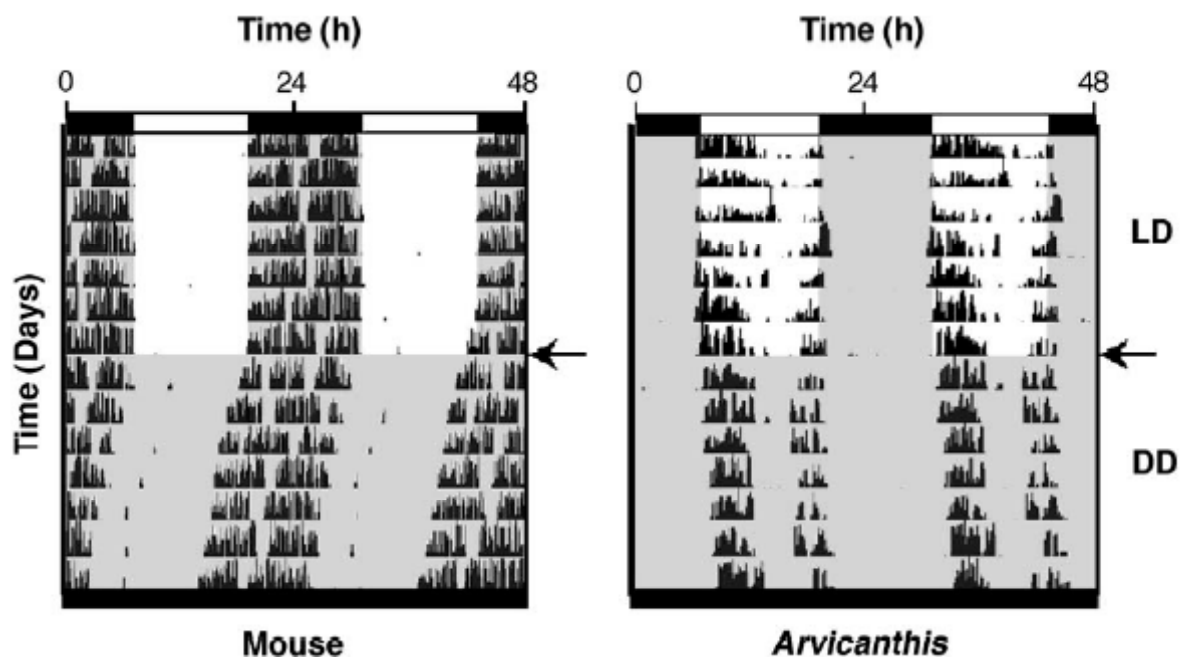


Figure 1: *Mus musculus* et *Arvicanthis ansorgei* présentent une activité locomotrice de roue clairement nocturne et diurne, respectivement.

Enregistrements représentatifs de l'activité locomotrice de roue en double représentation. Les animaux sont maintenus en conditions LD12:12 (barres horizontales blanches et noires en haut), avant d'être placés en obscurité constante (barre horizontale noire en bas) au moment indiqué par la flèche. Les zones grisées symbolisent l'obscurité. La souris *Mus musculus* présente un rythme journalier et circadien d'activité locomotrice nettement marqué. A l'inverse, l'activité locomotrice du rat *Arvicanthis ansorgei* est tout aussi rythmique mais s'effectue pendant le jour (subjectif). En libre cours, ces deux espèces montrent un rythme endogène inférieur (souris) et légèrement supérieur (*Arvicanthis ansorgei*) à 24h.

d'obscurité), la période du rythme d'activité est égale à exactement 24 heures, l'horloge endogène est donc capable de se **synchroniser** avec le monde extérieur pour être totalement en phase avec celui-ci. Les synchroniseurs, quelle que soit leur nature (biotique et abiotique) sont des "donneurs de temps" ou "**Zeitgebers**". Le synchroniseur le plus puissant est le cycle LD et par convention, l'arrivée du jour définit le ZT0 ("Zeitgeber Time 0"). L'horloge endogène peut donc être synchronisée par le monde extérieur, cela permet de conserver des relations de phase stables entre différents événements journaliers effectués par l'animal et les variations journalières de l'environnement. Par exemple, les personnes ayant effectué un voyage trans-méridien peuvent présenter des troubles du sommeil. Dans ce cas, leur horloge interne n'est pas en phase avec le nouvel environnement et aura besoin de quelques jours pour être resynchronisée ce qui permettra alors au voyageur de retrouver des moments de sommeil et d'éveil harmonieux.

Le caractère endogène des rythmes permet aux organismes de présenter une **réponse anticipatrice adaptée** et ainsi d'augmenter leur chance de survie (principe de "*predictive homeostasis*"). Le pic de cortisol, participant à la préparation de l'organisme à la phase d'éveil, survient en fin de phase de repos avant l'apparition du ZT du cycle LD. Cette capacité des organismes à anticiper les variations de l'environnement est encore plus évidente sur une période non plus de 24 heures mais d'une année. Par exemple, la coloration blanche du hamster sibérien (*Phodopus sungorus*) et l'engraissement du hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*), en vue du passage de l'hiver, doivent être amorcés avant que l'hiver ne soit installé, avant que l'environnement ne soit lui-même entièrement blanc. Pour se repérer dans le temps annuel, la majorité des animaux à physiologie saisonnière utilise les variations de durée d'éclairage sur 24 heures. En effet, la durée de jour sur 24 heures ou **photopériode** est plus courte en hiver qu'en été ce qui permet de synchroniser la physiologie des animaux sur une période d'un an.

Depuis quelques années, des évidences existent quant à l'interaction entre les systèmes circadien et saisonnier. Nous avons essayé de mieux comprendre comment les variations de la photopériode affectent le fonctionnement nyctéméral de l'horloge endogène et de l'une de ses cibles chez différents mammifères. Dans cette introduction, je présenterai tout d'abord le système circadien, la localisation anatomique de l'horloge endogène, ses propriétés neurochimiques, électriques et moléculaires. Ensuite, une seconde partie sera consacrée au système saisonnier, les supports essentiellement hormonaux des adaptations annuelles de la physiologie et les rôles des structures essentielles à cette adaptation.

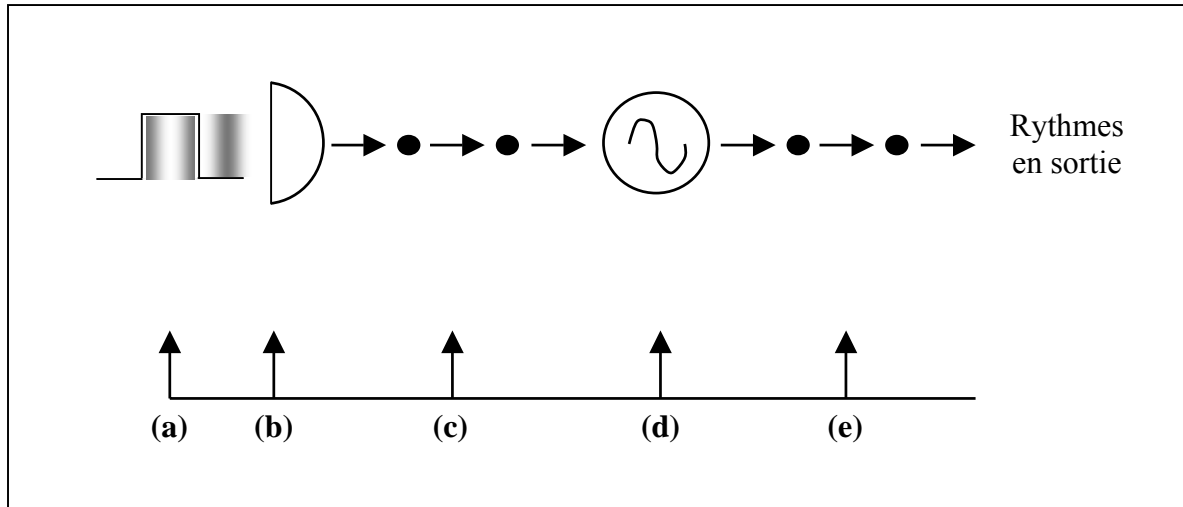


Figure 2 : Schématisation générale des propriétés d'une horloge (d'après Roennenberg & Merrow, 2003).

Pour qu'une structure, représentée en (d), soit qualifiée d'horloge, elle doit être organisée selon un axe bien défini. Les différentes composantes correspondent à (a) des signaux externes perçus par (b) le récepteur ; en (c), ces informations sont transmises par une voie de communication à (d), un générateur de rythmes, nécessaire et suffisant pour générer un rythme auto-entretenu. Ce générateur de rythmes permet ensuite l'existence de rythmes via une transduction de signaux de sortie représentée en (e).

1. Le système circadien.

1.1. INTERET D'UN SYSTEME CIRCADIEN.

La présence d'une horloge interne permet donc aux animaux de se repérer dans le temps journalier. L'une des démonstrations de la présence de cette horloge est la persistance d'un rythme d'activité locomotrice en conditions environnementales constantes. L'enregistrement de cette activité sur plusieurs jours permet le calcul de la période endogène des animaux. Or, la période endogène d'une souche de hamster syrien, la souche *tau*, est inférieure à celle des autres souches. Comme les animaux *tau* sont rythmiques en DD, ils possèdent bien une horloge interne mais dont le fonctionnement est perturbé. En revanche, en cycle LD, ces animaux sont normalement synchronisés à 24 heures. Afin de mettre en évidence quelle structure peut être qualifiée d' "horloge interne", nous devons donc définir quelles sont les propriétés que doit présenter une telle structure.

Sur la [figure 2](#) (d'après Roenneberg & Merrow, 2003) sont schématisées les propriétés d'une horloge. Un "générateur de rythmes" est nécessaire et suffisant pour obtenir une rythmicité et ce, de manière endogène, un "récepteur" correspond à la perception du monde extérieur et les parties "transduction des signaux d'entrée et de sortie" correspondent aux moyens par lesquels les informations sont transmises. Au cours de ce manuscrit, nous verrons que ce schéma peut s'appliquer aussi bien au niveau de l'organisme entier qu'au niveau cellulaire. Une horloge permet donc de **générer** et de **distribuer** des signaux de nature rythmique à l'organisme. De plus, bien que son fonctionnement soit totalement **auto-entretenu** (montré en DD), elle se **synchronise** avec l'environnement extérieur (montré en LD) afin d'être en phase avec lui. Ce sont ces trois grands axes de fonctionnement d'une horloge qui seront abordés dans cette partie.

1.2. UNE HORLOGE... DANS LE CERVEAU.

1.2.1. Evidences expérimentales.

La localisation d'une horloge circadienne cérébrale a été précisée notamment à partir de lésions d'une structure paire de l'hypothalamus qui repose sur le chiasma optique de part et d'autre du 3^{ème} ventricule, les SCN ("noyaux suprachiasmatisques") (voir [figure 3](#)). Ainsi,

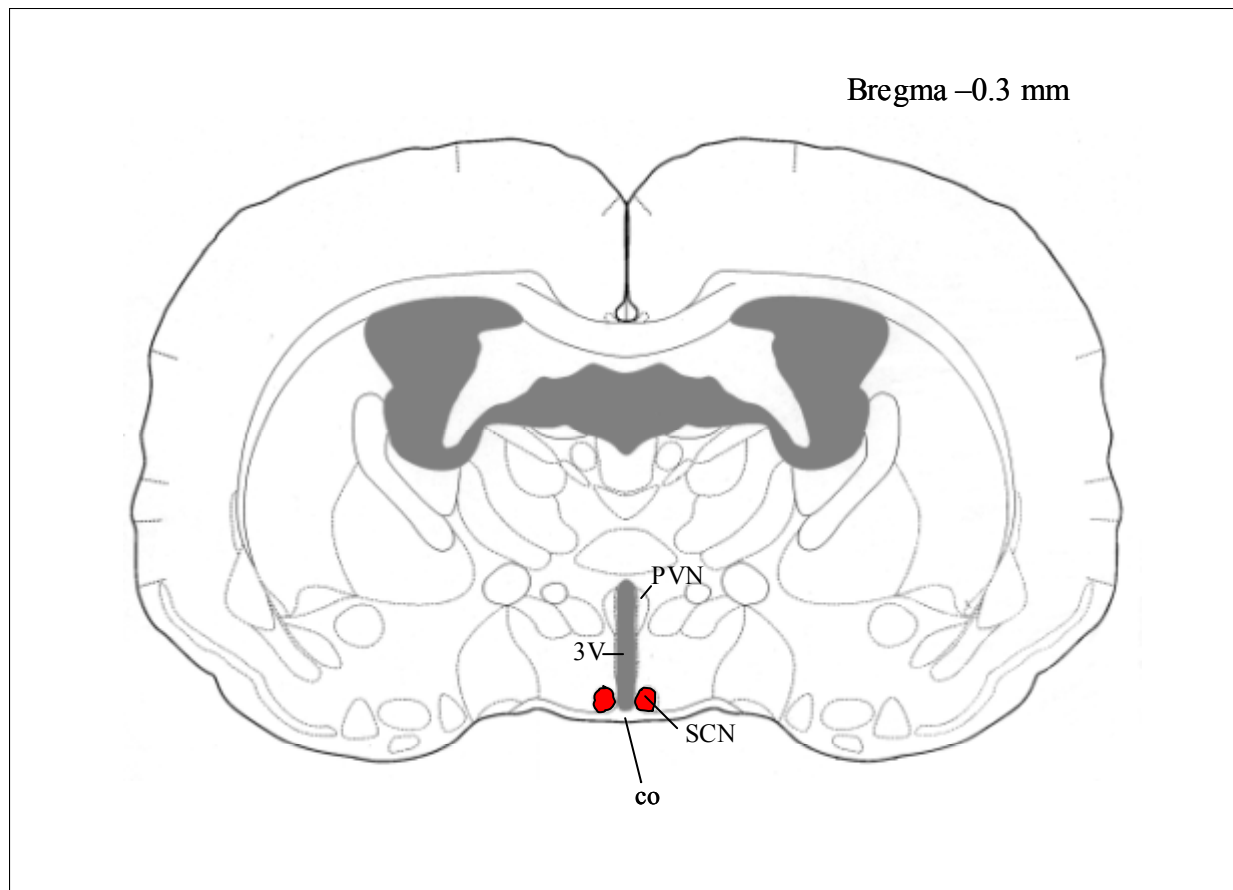


Figure 3 : Localisation des noyaux suprachiasmatiques chez le hamster doré (d'après Morin & Wood, 2001).

3V, troisième ventricule; co, chiasma optique; PVN, noyaux paraventriculaires hypothalamiques, SCN, noyaux suprachiasmatiques.

Stephan & Zucker (1972) et Moore & Eichler (1972) ont montré respectivement, que la lésion des SCN induisait une perte de la rythmicité de l'activité locomotrice et du contrôle du rythme de sécrétion de corticostérone. Par la suite, de nombreuses études effectuées chez beaucoup de mammifères ont montré que les SCN sont le siège de l'horloge endogène qui contrôle l'expression rythmique des fonctions physiologiques et comportementales, sur une période d'environ 24 heures.

Les animaux deviennent arythmiques après lésion des SCN, mais si des cellules des SCN d'un animal donneur sont greffées, ils retrouvent alors un comportement rythmique d'activité locomotrice (Silver *et al.*, 1990). Ralph et coll. (1990) ont réalisé des greffes à partir du mutant hamster syrien *tau*, dont la forme hétérozygote présente une activité circadienne d'environ 22 heures et la forme homozygote, une activité circadienne de 20 heures. La greffe ICV ("Intracérébroventriculaire") de SCN prélevés chez un mutant homozygote *tau*, réinstaure chez un animal sauvage ayant les SCN lésés et maintenu en condition de nuit constante, un rythme d'une période de 20 heures, la même que celle du donneur. Il en est de même chez des souris provenant de souches à comportement non rythmiques par diverses mutations géniques (Sujino *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces travaux, complétés par des données d'activité électrique des neurones des SCN *in vitro* (paragraphe A.1.2.3.), démontre que l'oscillateur endogène nécessaire à la genèse des rythmes circadiens, est localisé dans les SCN qui transmettent alors l'information rythmique à tout l'organisme.

1.2.2. Subdivisions histochimiques des SCN.

Les SCN sont constitués d'environ 16000 cellules chez le rat (van den Pol, 1980), ils s'étendent sur 900µm (van den Pol & Gorscs, 1986) et sur 600µm chez le hamster syrien (van den Pol, 1991) ce qui, pour reprendre l'expression de Till Roenneberg et Marta Merrow (2003) ne représente "environ que la taille d'un grain de riz, mais ses qualités sont remarquables". Les SCN n'ont pas une structure homogène et peuvent être subdivisés en plusieurs parties, en fonction du contenu en neuropeptides.

L'AVP ("Arginine ysopressin") est exprimée dans les SCN de façon non homogène. La localisation des neurones à AVP permet une subdivision des SCN : la partie dorso-médiane des SCN (dmSCN) (Swaab *et al.*, 1975 ; Vandesande *et al.*, 1975 ; van den Pol & Tsujimoto, 1985). Les pics d'ARNm et de peptide apparaissent pendant la phase lumineuse du cycle

jour/nuit en conditions LD et pendant le jour subjectif en conditions constantes DD (Uhl & Reppert, 1986 ; Reppert & Uhl, 1987 ; Yamase *et al.*, 1991 ; Tominaga *et al.*, 1992). Les neurones à AVP ont des projections vers la partie ventro-latérale des SCN (vlSCN) (Romijn *et al.*, 1997) qui n'exprime pas l'AVP, mais possède des neurones à VIP ("Vasoactive intestinal peptide"). Chez le rat, les pics d'ARNm et de peptide du gène *Vip* sont présents de nuit mais, chez cette espèce, ces variations journalières ne sont pas circadiennes (Takahashi *et al.*, 1989 ; Morin *et al.*, 1991 ; Shinohara *et al.*, 1993 ; Okamura *et al.*, 1989 ; Okamura & Ibata, 1994). Ainsi, **les SCN peuvent être subdivisés en une partie dorso-médiane (neurones à AVP) et en une partie ventro-latérale (neurones à VIP)**. De plus, les cellules du dmSCN sont allongées avec un large noyau et les contacts somato-somatiques sont nombreux alors que les cellules du vlSCN sont moins denses, plus sphériques et généralement plus grandes (van den Pol, 1980 ; Kalsbeek *et al.*, 1993 ; Moga & Moore, 1997). Outre ces deux neuropeptides permettant la subdivision principale des SCN, d'autres sont également exprimés au sein des SCN, et localisés dans des régions définies pour certains. De nombreux neurones à GABA et à glutamate sont présents, mais diffus au sein de l'ensemble des SCN et colocalisent avec le VIP ou l'AVP (Moore & Speh, 1993), les neurones à GRP ("Gastrin releasing peptide") se situent uniquement dans le vlSCN et le GRP colocalise avec le VIP (Okamura *et al.*, 1986) ; dans le dmSCN, il y a colocalisation de l'AVP et de l'enképhaline (Sakanaka *et al.*, 1990). A l'inverse, les neurones à somatostatine ne colocalisent ni avec l'AVP ni avec le VIP, car ils se situent entre le vlSCN et le dmSCN (Card *et al.*, 1988 ; Tanaka *et al.*, 1996). L'expression du gène *Calbindin* dans les SCN a également été montrée chez la souris et le hamster syrien. Cette expression présente une régionalisation ventro-dorsale, avec des neurones à CALB présents uniquement dans la région vlSCN (souris : Silver *et al.*, 1996a ; Ikeda & Allen, 2003, hamster : Menet *et al.*, 2003). Chez le hamster syrien, ces neurones ne sont présents que dans la partie centrale de l'étendue des SCN définissant ainsi une régionalisation de type rostro-caudale (Menet *et al.*, 2003).

En plus de ces compartimentations pour l'expression des neuropeptides, il y a des différences inter-espèces qui compliquent encore la structure anatomique des SCN. Par exemple, des terminaisons nerveuses à NPY ("Neuropeptide Y"), en provenance des feuilletts intergénéculés latéraux, sont situés principalement dans le vlSCN chez le hamster syrien et chez *Arvicanthis ansorgei* alors que chez le hamster sibérien et la souris, ils sont répartis dans l'ensemble des SCN (données du laboratoire non publiées).

Ainsi, la subdivision principale dmSCN vs vlSCN suppose des fonctionnements différents de ces deux sous-ensembles dans la génération, le maintien et la distribution de la rythmicité (Leak & Moore, 2001 ; Abrahamson & Moore, 2001).

Comme l'expression de l'Avp est circadienne mais pas celle du Vip chez le rat, nous avons cherché d'une part si cela peut être généralisé à d'autres espèces de rongeurs et d'autre part, si l'expression de ces deux neuropeptides participe aux variations saisonnières de l'activité de l'horloge centrale (variations qui seront présentées au [chapitre A.2.2.3.](#)).

1.2.3. Activité électrique des neurones des SCN.

L'une des méthodes pour obtenir des informations concernant l'activité d'une cellule ou d'un tissu consiste à caractériser la fréquence des décharges de ces neurones. Ainsi, Inouye et Kawamura (1979) ont montré *in vivo* que l'activité spontanée des neurones est circadienne au niveau de l'hypothalamus mais aussi en dehors de cette structure. En revanche, après isolation d'une portion de l'hypothalamus contenant les SCN, cette rythmicité disparaît dans le cerveau alors qu'elle persiste dans la zone contenant les SCN. Ce travail montrant le caractère autonome de l'activité électrique rythmique des SCN, a été confirmé par des expériences *in vitro* sur des tranches de tissus (Green & Gillette, 1982 ; Shibata *et al.*, 1982) même après plusieurs semaines de culture (Herzog *et al.*, 1997) avec, dans tous les cas, un maximum d'activité de jour, dépendant de la présence en Ca^{2+} (Shibata *et al.*, 1984, 1987). La méthode de réalisation des tranches est importante : dans toutes les études utilisant des tranches transversales, un seul pic d'activation des neurones a pu être enregistré (Bouskila & Dudek, 1993 ; Meijer *et al.*, 1997 ; Gribkoff *et al.*, 1998) alors qu'avec des tranches horizontales, deux pics, situés aux transitions subjectives jour-nuit et nuit-jour, ont été observés (Jagota *et al.*, 2000). Cependant, l'étude n'a pas permis de déterminer si ces deux pics représentent deux populations de neurones à activité unimodale ou une seule et même population de neurones ayant une activité bimodale.

Des enregistrements à long terme de l'activité des neurones, en culture dissociée, ont permis de mettre en évidence le fait que les cellules des SCN portent individuellement le caractère endogène et que les connections établies entre elles ne sont pas nécessaires à la genèse de la rythmicité (Welsh *et al.*, 1995 ; Liu *et al.*, 1997b ; Honma *et al.*, 1998a). En effet, après inhibition synaptique temporaire par application de TTX ("Tétradotoxine") de durée variable, les cellules retrouvent leur rythmicité en phase avec la phase projetée (calculée si les cellules n'avaient pas été inhibées).

Cependant, toutes les cellules des SCN ne présentent pas les mêmes caractéristiques électriques. Environ un quart des neurones des SCN ne présente pas d'activité électrique cyclique, c'est le cas notamment, des cellules à CALB (Honma *et al.*, 1998a ; Jobst & Allen, 2002). La synthèse de l'AVP est inhibée *in vitro* par application de TTX montrant ainsi la nécessité de cette activité électrique pour le rythme d'AVP (Arima *et al.*, 2002). L'amplitude des rythmes électriques mesurés est plus importante *in vitro* qu'*in vivo* (Meijer *et al.*, 1997). Ceci peut s'expliquer par le fait que la réalisation des tranches de tissus doit très certainement diminuer une partie des interactions entre les cellules des SCN ce qui diminuerait les décalages de phase d'activité électrique. Et, en plus d'être circadienne, l'activité des cellules des SCN est ultradienne et ces rythmes ultradiens, plus marqués *in vivo*, participeraient à l'augmentation de la dispersion ; il en résulterait une diminution de l'amplitude générale observée *in vivo* (Meijer *et al.*, 1997). Ainsi, le pic général de l'activité électrique des cellules des SCN se situe de jour, mais *in vivo* des décalages de phases sont très importants, avec des cellules dont l'activité peut se situer en opposition de phase avec les autres (Schaap *et al.*, 2003) et la période des cellules varie entre 20h et 28.3h (Honma *et al.*, 1998a).

1.2.4. Un couplage nécessaire à la construction d'un message rythmique.

Les cellules des SCN présentent leur propre activité endogène, mesurée lors d'enregistrements *in vivo* ou *in vitro* ; on peut alors se demander si elles sont couplées pour générer un message circadien global et comment ce couplage est réalisé. En utilisant des multi-électrodes, l'étude d'animaux mutants a permis de répondre à la première question. Les enregistrements de l'activité unitaire de plusieurs neurones dissociés en culture chez le mutant *tau*, montrent que la moyenne de leur période endogène est directement proportionnelle à la période endogène de l'activité locomotrice de l'animal (Liu *et al.*, 1997b, voir [figure 4A](#)). Par la même technique expérimentale, Honma et coll. (1998a) ont montré chez le rat, que la moyenne des périodes individuelles d'activité électrique des neurones de SCN provenant de différents animaux, correspond à la moyenne des périodes d'activité locomotrice mesurées sur d'autres animaux. Cependant une plus grande variabilité est trouvée pour les périodes mesurées pour l'activité électrique, que pour celle des périodes de l'activité locomotrice (voir [figure 4B](#)). Ainsi, bien que les cellules des SCN soient pour la plupart des oscillateurs circadiens indépendants, il semble que leur synchronisation soit nécessaire au moins pour le contrôle de l'activité locomotrice.

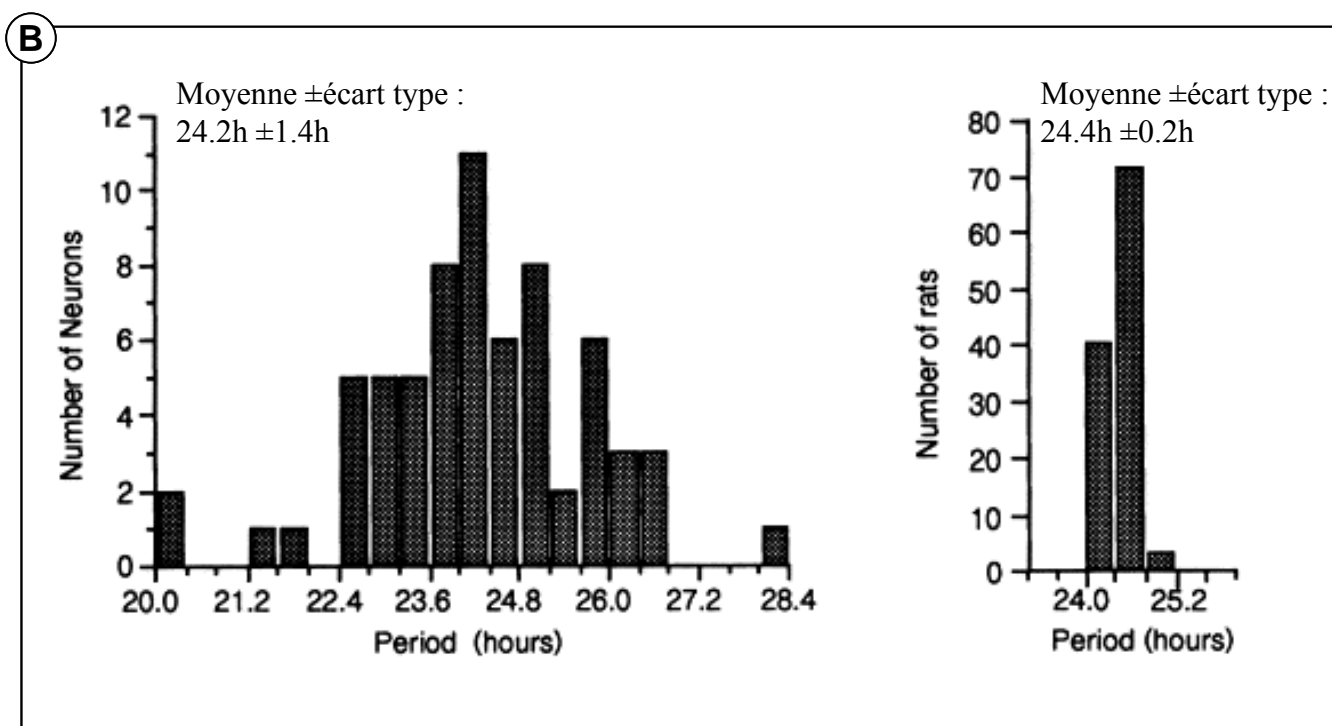
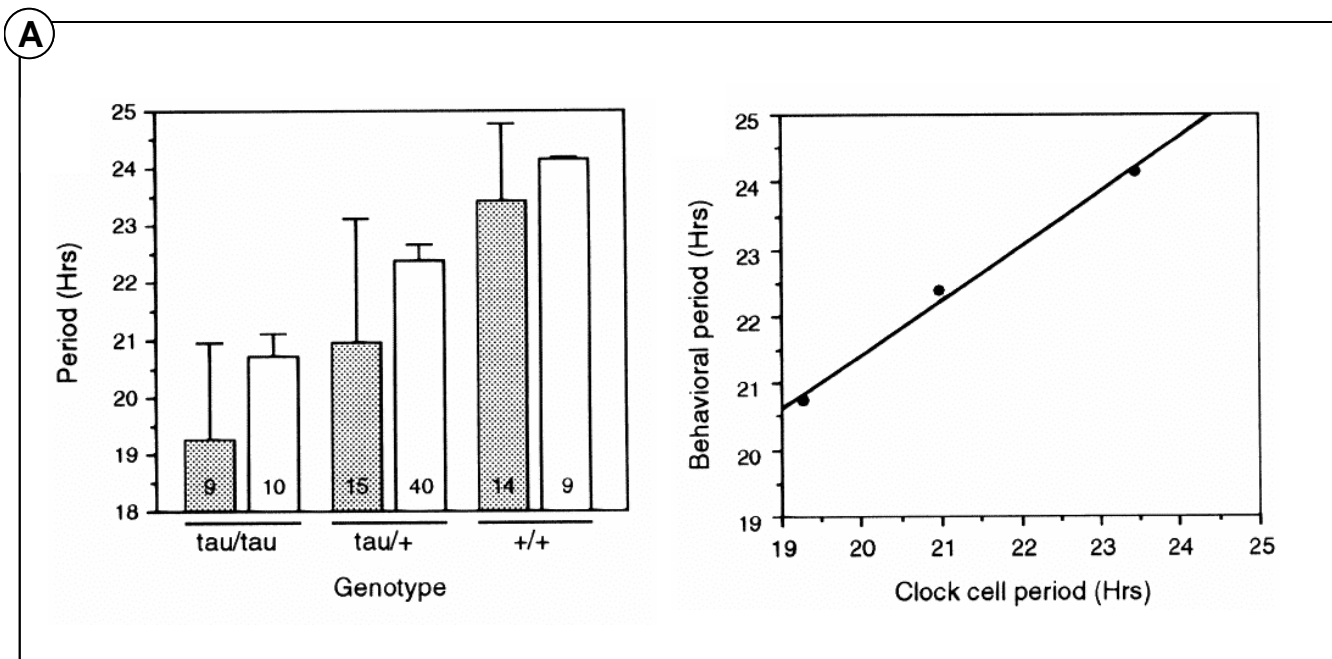


Figure 4 : La période moyenne d'activité des neurones des SCN est corrélée avec celle de l'activité locomotrice chez le hamster syrien (d'après Honma et al., 1998a et Hirota & Fukada, 2004).

A. A gauche, moyenne \pm écart type des périodes d'activité des neurones des SCN (barres grises) et des périodes d'activité locomotrice (barres blanches) chez le hamster syrien de souche mutante *tau* homozygote (*tau/tau*), hétérozygote (*tau/+*) ou de souche sauvage (*+/+*). A droite, régression effectuée à partir des résultats de gauche. La régression ($r^2=0.99$) est calculée avec la formule $y = 0.81x + 5.20$ où y = période comportementale et x = période cellulaire d'activité (en heures). **B.** Distribution des périodes circadiennes d'activité rythmique de 88 neurones des SCN mesurés à partir d'une culture dissociée de SCN de 15 animaux (à gauche) et d'activité locomotrice de roue de 114 animaux (à droite) chez le rat.

La synchronisation des neurones des SCN pourrait faire intervenir les connexions entre neurones. En effet, *in vitro*, des neurones couplés présentent le même rythme de décharge (en termes de phase et de période) mais ce couplage est perdu à la suite d'un traitement au TTX (Honma *et al.*, 2000) et, *in vivo*, les potentiels d'action Na^+ dépendants permettent d'établir la synchronisation des neurones (Yamaguchi *et al.*, 2003). Les jonctions électriques GAP que les neurones établissent entre eux, semblent également intervenir dans cette synchronisation *in vivo* mais pas *in vitro* (Welsh & Reppert, 1996). Les souris mutantes connexin-36^{-/-} rendant impossible la formation de jonctions GAP, présentent une augmentation de l'activité locomotrice de jour, ce qui pourrait traduire une plus faible amplitude de la rythmicité circadienne (Long *et al.*, 2005).

La synchronisation des neurones des SCN pourrait également impliquer les astrocytes. Les prolongements astrocytaires présentent une variation circadienne, avec un maximum obtenu de jour (Lavialle & Serviere, 1993 ; Harley *et al.*, 2001). Ces changements dynamiques pourraient moduler les interactions neuronales en modifiant les connexions neurones-neurones, la composition du milieu extracellulaire...

1.2.5. Subdivisions histochimiques....et fonctionnelles des SCN ?

Les neurones à VIP et à AVP étant localisés dans des régions bien définies des SCN, on peut supposer que leur apport respectif dans la formation des rythmes circadiens, est différent. La voie afférente majeure aux SCN est glutamatergique et aboutit en majorité au niveau des cellules à VIP (Ibata *et al.*, 1989 et voir [chapitre A.1.2.6.](#)). L'application de NMDA (pendant 15 min et lorsque les quantités d'AVP libérées sont les plus faibles) sur des tranches hypothalamiques mises en culture, induit des décalages de phase opposés de la sécrétion d'AVP et de VIP (avance de 1.5h pour l'AVP et retard de 5.3h pour le VIP, Shinohara *et al.*, 1995). Ceci met en évidence le fait que ces deux populations de neurones intègrent différemment un message, ce qui suppose qu'elles fonctionnent différemment. L'équipe de Watanabe (2000) a montré qu'en appliquant du VIP sur des tranches de SCN, des décalages de phase apparaissent pour la libération rythmique d'AVP, avec un retard ou une avance de phase en fonction de l'heure d'application.

La présence de deux oscillateurs a également été montrée par des enregistrements de l'activité électrique des neurones. Si des tranches de SCN sont prélevées et enregistrées immédiatement après un décalage du cycle LD de 6 heures, ou 3 jours après, deux pics d'activité électrique

peuvent être observés, correspondant au milieu de jour de l'ancien cycle LD et au milieu de jour du nouveau cycle. De plus, si les parties vlSCN et dmSCN sont séparées, la partie vlSCN se synchronise plus rapidement au nouveau cycle LD que la zone dmSCN (Albus *et al.*, 2005). L'application continue d'un antagoniste du GABA (pour le récepteur GABA_A) provoque le même effet (Albus *et al.*, 2005, et pour revue : Piggins & Loudon, 2005). Ainsi, les parties dmSCN et vlSCN seraient régulées différemment et les deux oscillateurs différents constitueraient les SCN. Les parties dmSCN et vlSCN, subdivisions anatomiques des SCN, présentent donc une réalité fonctionnelle.

1.2.6. L'afférence photique majeure des SCN.

Les fibres afférentes aux SCN proviennent de la rétine, des feuillets intergénéculés latéraux, des noyaux du raphé, de l'hypothalamus et des SCN eux-mêmes (voir [figure 5](#), Moga & Moore, 1997 ; van Esseveldt *et al.*, 2000 ; Abrahamson & Moore, 2001 ; Morin *et al.*, 2003). Cependant, les voies principales d'entrée proviennent de la rétine (vers le vlSCN) et des neurones à VIP (vers le dmSCN) (Abrahamson & Moore, 2001). Les cellules ganglionnaires de la rétine projettent directement vers les SCN par le RHT ("Tractus rétinohypothalamique") et seule cette voie sera détaillée ici.

1.2.6.1. Anatomie et neurotransmetteurs impliqués.

Le RHT projette majoritairement vers le vlSCN chez de nombreuses espèces de mammifères étudiées et les neurones des SCN sensibles à la lumière sont principalement situés dans cette zone (Meijer *et al.*, 1986 ; Kim & Dudek, 1993 ; Cui & Dyball, 1996 ; Jiang *et al.*, 1997). Deux neurotransmetteurs semblent impliqués : le glutamate principalement et le polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire (pour revue, Hannibal, 2002). Tous deux sont exprimés dans le RHT et seraient libérés dans les SCN en réponse à une stimulation lumineuse (Liou *et al.*, 1986 ; Fukuhara *et al.*, 1997). La présence de récepteurs aux deux neurotransmetteurs a été démontrée (Colwell *et al.*, 1990 ; Mintz *et al.*, 1999 ; Hannibal *et al.*, 2002).

1.2.6.2. Les photorécepteurs réiniens.

Les cônes et les bâtonnets permettent à la fois la transmission de l'information lumineuse visuelle mais aussi "non visuelle", c'est à dire l'information lumineuse parvenant aux SCN. Dans ce dernier cas, ils ne semblent pas être les seuls photorécepteurs impliqués : des souris

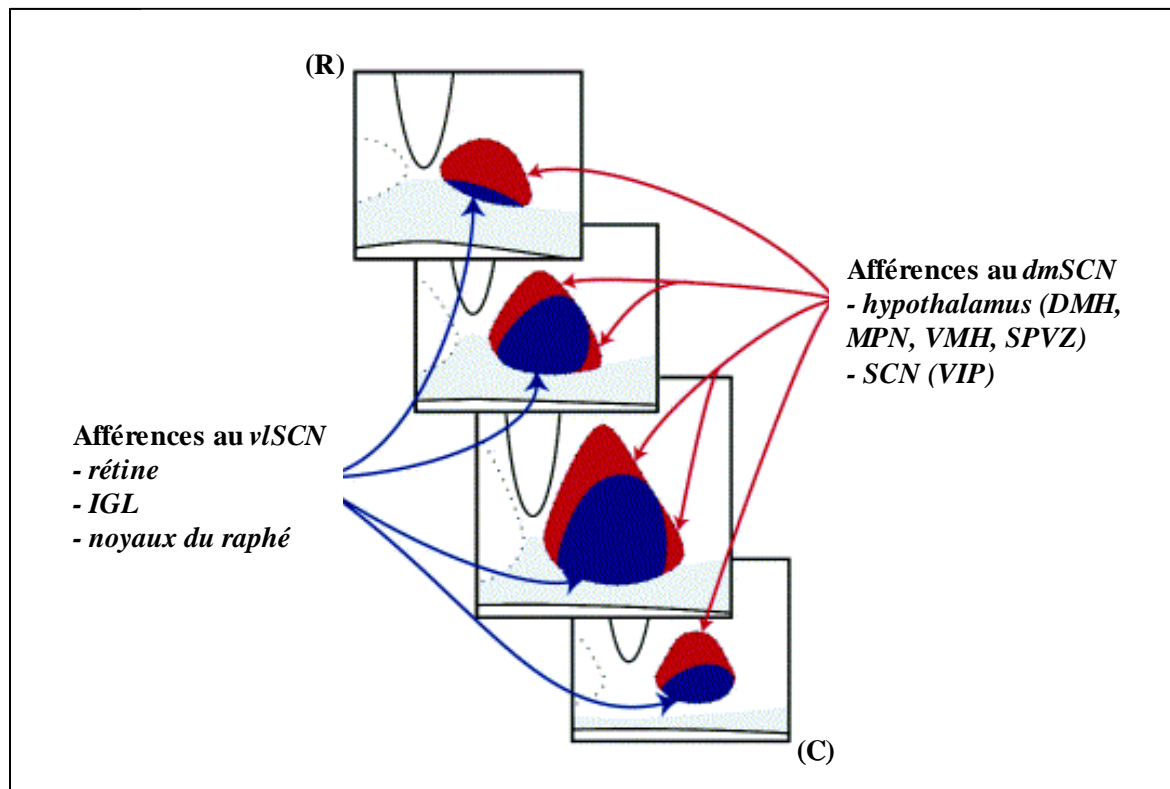


Figure 5 : Représentation schématique des principales voies afférentes aux SCN en fonction de la subdivision vlSCN et dmSCN chez la souris (d'après Moga & Moore, 1997 ; Abrahamson & Moore, 2001).

Sur plusieurs plans rostro-caudaux (R-C), la partie *Core* et la partie *Shell* des SCN sont représentées en foncé et en clair, respectivement. DMH, noyaux hypothalamiques dorsomédians ; MPN, noyaux préoptiques médians ; SPVZ, zone subparaventriculaire ; VMH, noyaux hypothalamiques ventromédians.

mutantes pour les cônes et les bâtonnets (souris *rd/rd cl* avec *rd*, rodless et *cl*, coneless) gardent leur capacité à être entraînées par des cycles LD tandis que des souris énuclées en sont incapables (Foster *et al.*, 1991 ; Lucas *et al.*, 1999, 2001 ; Thompson *et al.*, 2001 ; Foster & Hankins, 2002 ; Klerman *et al.*, 2002). Pour la recherche de nouveaux acteurs, plusieurs candidats ont été proposés : des gènes codant des flavoprotéines, les *Cryptochromes 1* et *2* et une nouvelle opsine, la mélanopsine (pour revue, Berson, 2003).

Les *Cryptochromes* font partie des gènes principaux de l'horloge moléculaire des SCN (voir [paragraphe A.1.3.1.1.](#)) et sont exprimés dans la rétine. Leur implication dans la transmission de l'information photique a été évoquée mais les animaux de souche *Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}* tout comme ceux de souche *Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} rd/rd cl* conservent des propriétés d'entraînement similaire à celles des souris de type sauvage (Griffin *et al.*, 1999 ; Selby *et al.*, 2000 ; Van Gelder *et al.*, 2002, 2003).

L'expression du gène *Mélanopsine* a été mise en évidence tout d'abord dans la rétine du xénope (Provencio *et al.*, 1998) puis dans la rétine des mammifères (Provencio *et al.*, 2000, 2002 ; Berson *et al.*, 2002 ; Hattar *et al.*, 2002). Les cellules ganglionnaires exprimant ce gène projettent majoritairement vers les SCN (Gooley *et al.*, 2001 ; Hannibal *et al.*, 2002 ; Hattar *et al.*, 2002 ; Sollars *et al.*, 2003). Afin d'étudier son implication possible dans les phénomènes d'entraînement photiques des SCN, plusieurs groupes ont réalisé des souches mutantes pour ce gène (*Opn4^{-/-}*). La période d'activité locomotrice de ces souris reste identique à celle des souris sauvages en conditions LD et DD. En revanche, en conditions LL, la période est plus courte et la réponse à un créneau lumineux appliqué au cours de la nuit est plus faible (Panda *et al.*, 2002b, 2003 ; Ruby *et al.*, 2002). L'expression de *Mélanopsine* semble donc jouer un rôle dans le système circadien ce qui a été confirmé par l'étude d'animaux de souche *Opn4^{-/-} rd/rd cl*. Ces souris ne sont plus sensibles à la lumière, ni après l'application d'un créneau lumineux de courte durée lorsque les animaux sont placés en DD, ni après l'application des cycles LD (Hattar *et al.*, 2003 ; Panda *et al.*, 2003). Comme ces souris présentent des projections des cellules ganglionnaires ainsi qu'une expression des *Cryptochromes* normale, il paraît clair que les cônes, les bâtonnets et la mélanopsine participent tous à la transmission de l'information photique aux SCN.

1.2.7. Distribution des messages rythmiques efférents aux SCN.

Des tranches de SCN en culture libèrent rythmiquement de l'AVP et du VIP dans le milieu de culture montrant ainsi que ces neuropeptides jouent un rôle dans la médiation des signaux

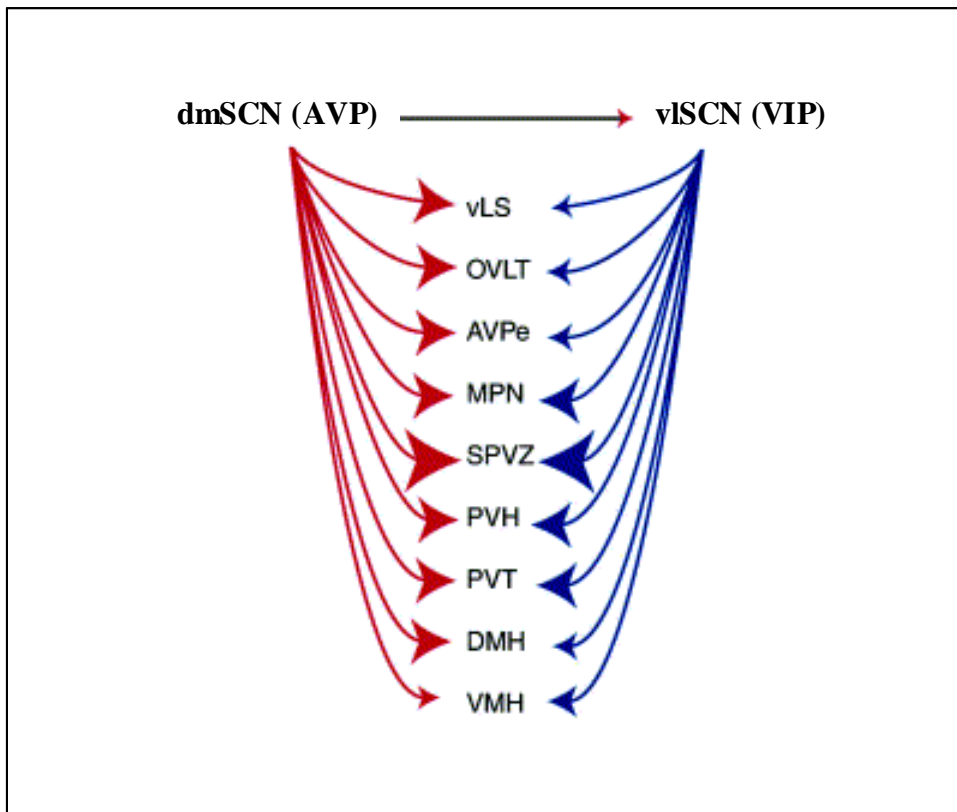


Figure 6 : Représentation schématique des voies efférentes aux SCN en fonction de la subdivision vlSCN et dmSCN (d'après Abrahamson & Moore, 2001).

Les voies de projections des parties Core et Shell des SCN sont représentées par des flèches dont la taille est fonction de la quantité de fibres. AVPe, noyaux périventriculaires antéroventraux ; DMH, noyaux hypothalamiques dorsomédians ; MPN, noyaux préoptiques médians ; OVLT, organum vasculosum lamina terminalis ; PVH, noyaux paraventriculaires hypothalamiques ; PVT, noyaux paraventriculaires thalamiques ; SPVZ, zone subparaventriculaire ; vLS, septum latéral ventral ; VMH, noyaux hypothalamiques ventromédians.

efférents aux SCN (Gillette & Reppert, 1987 ; Shinohara *et al.*, 1994). *In vivo*, aucune projection GRP n'a pu être mise en évidence à l'opposé des nombreuses projections VIP ou AVP chez le rat, le hamster syrien et la souris (Watts *et al.*, 1987 ; Castel *et al.*, 1990 ; Kalsbeek *et al.*, 1993 ; Abrahamson & Moore, 2001, et pour revue, van Esseveldt *et al.*, 2000). Elle concernent principalement le septum latéral ventral, les noyaux périventriculaires antéroventraux, le noyau préoptique médian, les noyaux paraventriculaires thalamiques, les noyaux hypothalamiques dorso et ventro médians (DMH et VMH) et surtout les noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN) et la zone subparaventriculaire (SPVZ) (Abrahamson & Moore, 2001). Il est à noter que ces cibles ne sont pas connectées de manière identique aux SCN, par exemple, le VMH reçoit majoritairement des fibres à VIP, le DMH des fibres à AVP tandis que les PVN et le SPVZ reçoivent des fibres à AVP et des fibres à VIP en proportions équivalentes (voir [figure 6](#)). Les rôles précis de chacune de ces connexions ne sont pas très bien déterminés mais les deux voies les plus documentées concernent la régulation de la libération des glucocorticoïdes (Moore & Eichler, 1972 ; Kalsbeek *et al.*, 1992, 1996 ; Meyer-Bernstein *et al.*, 1999 ; Perreau-Lenz *et al.*, 2004) et de la mélatonine (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Ces deux hormones présentent un profil circadien de libération sous dépendance des SCN et représentent donc une traduction hormonale de l'activité journalière des SCN. Nous verrons en détail pour illustrer le contrôle par les SCN par voies nerveuses, l'exemple du contrôle de la synthèse de mélatonine. Nous verrons ensuite si la libération de différents facteurs par les SCN participe à la distribution de signaux rythmiques.

1.2.7.1. Voies nerveuses puis endocrines.

La mélatonine est une hormone libérée par la glande pinéale (ou épiphyse) uniquement pendant la phase nocturne du nyctémère (pour revue Simonneaux & Ribelayga, 2003). Diverses études, notamment de traçage, ont pu mettre en évidence la voie polysynaptique permettant le contrôle de cette glande endocrine par les SCN (voir [figure 7](#)). Brièvement, les PVN, la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière et les ganglions cervicaux supérieurs, servent de relais de l'information entre les SCN et la glande pinéale (Larsen, 1999 ; Teclemarian-Mesbah *et al.*, 1999). Au sein de cette glande, l'enzyme limitante de la synthèse de mélatonine est l'AA-NAT ("Aryl-acrylamine N-acétyl transférase"). Le rythme de présence des ARNm de l'*Aa-nat* comme celui de la libération de mélatonine est aboli par lésion de l'une des structures de la voie de contrôle, confirmant ainsi leur implication dans

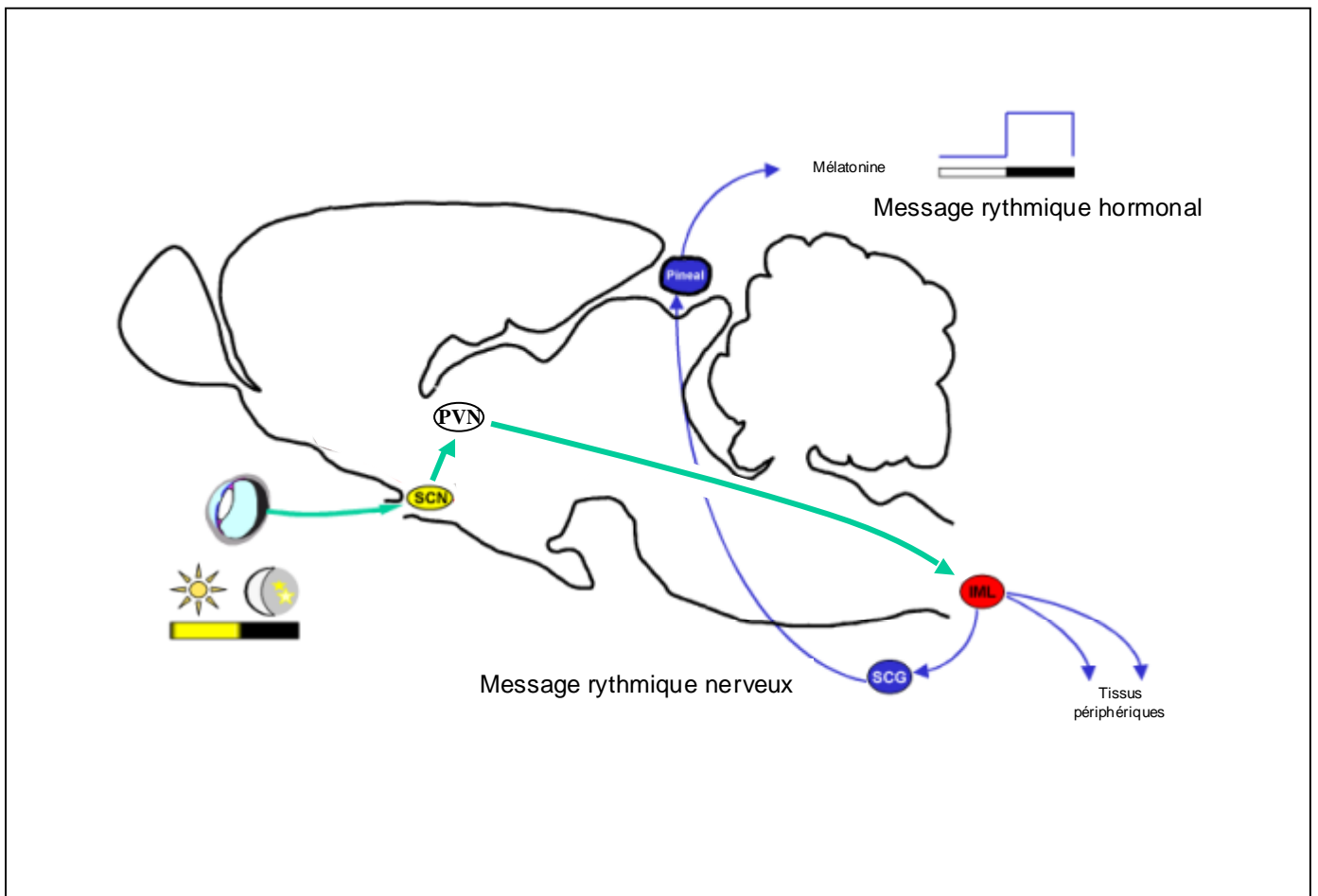


Figure 7 : Représentation schématique de la voie polysynaptique permettant aux SCN de contrôler la synthèse de mélatonine.

IML, colonne intermédiolatérale de la moelle épinière ; PVN, noyaux paraventriculaires hypothalamiques ; SCG, ganglions cervicaux supérieurs.

cette voie polysynaptique (Kalsbeek *et al.*, 2000 ; Garidou *et al.*, 2001 ; Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Chez les rongeurs, le contrôle de l'activité de l'AA-NAT s'effectue au niveau transcriptionnel et, une fois traduite en protéine, l'enzyme est directement active. Le contrôle de synthèse et de libération de mélatonine est donc dû au contrôle transcriptionnel du gène *Aa-nat* chez les rongeurs. Chez le mouton, la transcription de l'*Aa-nat* est constitutive, le contrôle est post-traductionnel. En effet, bien que la synthèse de AA-NAT soit constante sur 24 heures, l'activité de l'enzyme est plus élevée de nuit ce qui aurait pour origine une inhibition nocturne de sa dégradation (pour revue : Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Dans le but de déterminer quels sont les neurotransmetteurs impliqués dans le relais SCN-PVN, Kalsbeek et coll. (1999, 2000) ont administré par microdialyse inverse de l'AVP ou de la bicuculline (antagoniste du GABA) au niveau des PVN et ont suivi le décours temporel de libération de mélatonine. Ainsi, ils ont démontré que l'AVP n'a pas d'effet sur la libération de mélatonine mais que le GABA permet son inhibition. Par la suite, une autre étude a permis de confirmer ce rôle inhibiteur du GABA qui interviendrait pendant la phase lumineuse du cycle jour/nuit (Perreau-Lenz *et al.*, 2005). Une injection intrapéritonéale de MK801 (antagoniste glutamatergique pour le récepteur NMDA), ou une application locale au niveau des PVN, permet une diminution du niveau de mélatonine, révélant un contrôle activateur par le glutamate (Vuillez *et al.*, 1998 ; Perreau-Lenz *et al.*, 2004). Une alternance entre messages activateur et inhibiteur en partance des SCN avait été évoquée (Kalsbeek & Buijs, 1996) tout comme dans le contrôle des cycles veille-sommeil (Sun *et al.*, 2000, 2001). Les SCN, via leurs projections vers les PVN, permettent de contrôler la libération de mélatonine par un jeu d'activation (glutamate) et d'inhibition (GABA) de leurs neurones cibles situés dans les PVN.

Les sécrétions rythmiques de ces hormones (mélatonine, glucocorticoïdes) permettent donc une action dépendante du temps sur leurs cibles. Les SCN, à la base de ces contrôles, n'agissent pas uniquement par l'intermédiaire de ces hormones. Ils possèdent également des connections entièrement nerveuses avec différents organes, notamment le foie (Kalsbeek *et al.*, 2001). La sensibilité des organes aux messages nerveux et/ou hormonaux dus aux SCN est alors différente d'un organe à l'autre. En effet, certains tissus semblent plus sensibles aux messages nerveux (cœur, muscle striés, rate) et d'autres aux messages hormonaux (foie et rein) (Guo *et al.*, 2005). Un même organe peut également présenter des différences de sensibilité à ces messages au regard de la fonction considérée (Terazono *et al.*, 2003 ; Cailotto *et al.*, 2005). Ainsi, les SCN contrôlent l'activité des différents organes par l'intermédiaire du

système nerveux et du système endocrine ce qui permet une organisation temporelle des différents rythmes physiologiques.

1.2.7.2. Des facteurs diffusibles.

Une greffe de SCN à un animal receveur ayant subi préalablement une lésion des SCN, suffit à réinstaurer une rythmicité comportementale (Silver *et al.*, 1990). Même dans le cas où le greffon est encapsulé (excluant toute création de synapses) et placé dans le troisième ventricule, le comportement rythmique d'activité locomotrice est rétabli (Silver *et al.*, 1996b). Cette étude démontre que les SCN peuvent contrôler au moins certains rythmes par libération directe de facteurs. Différents candidats semblent pouvoir intervenir...

◆ AVP

Au début des années 80, un rythme circadien d'AVP dans le liquide céphalorachidien du rat fut montré ainsi que sa synchronisation au cycle LD (Mens *et al.*, 1982 ; Reppert *et al.*, 1982 ; Schwartz *et al.*, 1983). Ce rythme est indépendant de celui retrouvé dans la circulation sanguine puisque, d'une part la perméabilité de la barrière hématoencéphalique à l'AVP est très faible (Wang *et al.*, 1981 ; Ang & Jenkins, 1982 ; Stark *et al.*, 1984) et d'autre part, une hypophysectomie ne diminue pas les taux d'AVP dans le liquide céphalorachidien (Dogterom *et al.*, 1977). En revanche, une lésion des SCN abolit ce rythme mais aussi les niveaux détectables de ce peptide dans le liquide céphalorachidien tandis qu'une ablation des PVN, de la glande pinéale ou de l'hypophyse n'ont pas d'effet sur cette rythmicité (Schwartz & Reppert, 1985 ; van Esseveldt *et al.*, 1999). Suite à une section post-SCN de l'hypothalamus, les quantités d'AVP sont plus faibles mais la rythmicité persiste ce qui met en évidence que les SCN pourraient libérer directement de l'AVP dans le troisième ventricule, ou par l'intermédiaire d'une structure périventriculaire, sans faire intervenir d'autres structures (Schwartz & Reppert, 1985). Le rôle circadien précis du rythme d'AVP dans le liquide céphalorachidien n'est pas encore élucidé mais il semble intervenir dans les rythmes de veille-sommeil (Kruisbrink *et al.*, 1987 ; van Esseveldt *et al.*, 2000). L'AVP pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de l'activité locomotrice. Cette hypothèse provient du fait que le rat *Brattleboro* (déficient en AVP) présente une quantité d'activité locomotrice moindre que le rat sauvage (Ingram *et al.*, 1998). Cependant, en comparant plusieurs souris d'une même souche, Hochstetler et coll. (2004) montrent que les différences de quantité journalière d'activité locomotrice entre animaux ne sont pas corrélées aux différences de marquage pour

l'AVP. De plus, une greffe de SCN ne permet de réinstaurer le comportement d'activité locomotrice que si les neurones à CALB font partie du greffon. En effet, les greffons pourvus en neurones à AVP et dépourvus en neurones à CALB n'induisent pas de rythmicité de l'activité locomotrice (LeSauter & Silver, 1999).

◆ *PK2*

Le gène *Pk2* ("Prokineticin 2") exprimé rythmiquement et de façon circadienne dans les SCN de la souris, présente un pic d'ARNm de jour (Cheng *et al.*, 2002, 2005) et interviendrait dans différents processus circadiens et non circadiens (pour revue, Zhou & Cheng, 2005). Tout comme le TGF α , son application en ICV inhibe l'activité locomotrice (Cheng *et al.*, 2002). De plus, un créneau lumineux appliqué de nuit, bloquant l'activité locomotrice (Redlin & Mrosovsky, 1994), augmente les quantités d'ARNm de *Pk2* dans les SCN (Cheng *et al.*, 2002, 2005). Cependant, le récepteur de la PK2 est absent de la SPVZ (Cheng *et al.*, 2002) alors que cette structure est impliquée dans le contrôle de l'activité locomotrice (Lu *et al.*, 2001). De plus, si la PK2 est un acteur inhibiteur de l'activité locomotrice, son expression de jour chez les rongeurs nocturnes devrait être en opposition de phase chez les rongeurs diurnes. Or, chez *Arvicanthis niloticus*, le pic d'expression de *Pk2* s'effectue également de jour (Lambert *et al.*, 2005)... Il reste possible que la PK2 agisse comme un agent activateur de l'activité locomotrice chez les rongeurs diurnes mais son récepteur est également absent de la SPVZ chez *Arvicanthis niloticus* (Lambert *et al.*, 2005). Comme ce récepteur est présent au sein des SCN chez ces deux espèces, il est probable que la PK2 a plus un rôle dans la communication entre cellules des SCN que dans le contrôle direct de l'activité locomotrice.

◆ *TGF α*

Le TGF α ("Transforming growth factor α ") appartenant à la famille des EGF ("Epidermal growth factor") se fixe préférentiellement sur le récepteur à tyrosine kinase ErbB de type 1 (également appelé EGFR, "epidermal growth factor receptor 1"). Ce récepteur s'associe ensuite avec ErbB2 pour induire l'action du TGF α (Jones *et al.*, 1999). Les actions du TGF α sont très variées et concernent la migration cellulaire, la différenciation des cellules, le développement pubertaire (Barrandon & Green, 1987 ; Ma *et al.*, 1992 ; Santa-Olalla & Covarrubias, 1995 et pour revue, Yarden & Sliwkowski, 2001) et, depuis peu, il a été démontré comme étant impliqué dans le contrôle de l'activité locomotrice. Présent dans les SCN du macaque (Ma *et al.*, 1992, 1994) et du hamster syrien (Kramer *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002), son expression est rythmique avec un pic d'ARNm se situant en milieu de jour chez le

hamster syrien (Kramer *et al.*, 2001). Le TGF α est également présent dans l'hippocampe, l'hypothalamus et l'hypophyse avec une expression qui dépend du sexe chez la souris (Koshibu & Levitt, 2005). La production de TGF α dans les SCN est principalement due aux astrocytes (Li *et al.*, 2002) et il est directement relargué dans le milieu extracellulaire (Pandiella & Massague, 1991). De plus, les neurones exprimant ce facteur n'expriment pas l'AVP (van der Zee *et al.*, 2005). Par infusions ICV de TGF α à court et à long terme, l'activité locomotrice des hamsters syriens est inhibée (Kramer *et al.*, 2001 ; Snodgrass-Belt *et al.*, 2005). Le TGF α serait donc un agent sécrété par les SCN et inhibiteur de l'activité locomotrice. La présence d'EGFR dans la SPVZ (Ma *et al.*, 1992 ; Kramer *et al.*, 2001) confirme cette idée car la lésion de cette structure perturbe l'activité locomotrice (Lu *et al.*, 2001). Cet effet du TGF α sur l'activité locomotrice est confirmé par injection d'EGF, un autre ligand de l'EGFR non exprimé dans les SCN (Kramer *et al.*, 2001). Cependant, l'application d'un peptide similaire à l'EGF, la neureguline-1b, qui pourtant n'active pas l'EGFR mais l'ErbB de types 3 et 4, provoque les mêmes effets (Snodgrass-Belt *et al.*, 2005). Le TGF est-il le seul (*bon*) candidat pour le contrôle de l'activité locomotrice ?

Des souris mutantes *waved-2* (présentant une baisse de 80 à 95% de l'activité de l'EGFR, les souris *Egfr*^{-/-} n'étant pas viables, Luetke *et al.*, 1994 ; Threadgill *et al.*, 1995) présentent une activité de jour élevée par rapport aux individus sauvages (Kramer *et al.*, 2001) ce qui peut s'expliquer par une diminution d'inhibition par le TGF α . Cependant, en conditions constantes, le comportement locomoteur de ces deux souches de souris est identique. Le TGF α ne jouerait-il un rôle dans le contrôle de l'activité locomotrice qu'en conditions d'alternance LD ? De nouvelles études doivent être menées pour tenter de clarifier (*la réelle*) l'implication de TGF α dans le contrôle de l'activité locomotrice...

Ainsi, nous avons cherché à déterminer si l'effet inhibiteur du TGF α sur l'activité locomotrice peut se généraliser à d'autres espèces que la souris et le hamster syrien.

1.2.8. Conclusion.

Dans cette partie, schématisée [figure 8](#) pour reprendre le principe de la figure 2, la partie "récepteur" correspond à la rétine, la voie "transduction des signaux d'entrée" est constituée principalement par le tractus rétino-hypothalamique, le "générateur de rythmes" aux SCN et la partie "transduction des signaux" aux différentes voies de sortie de l'horloge. Ainsi, ces

différents niveaux tissulaires d'organisation des rythmes circadiens permettent le fonctionnement circadien de l'organisme entier.

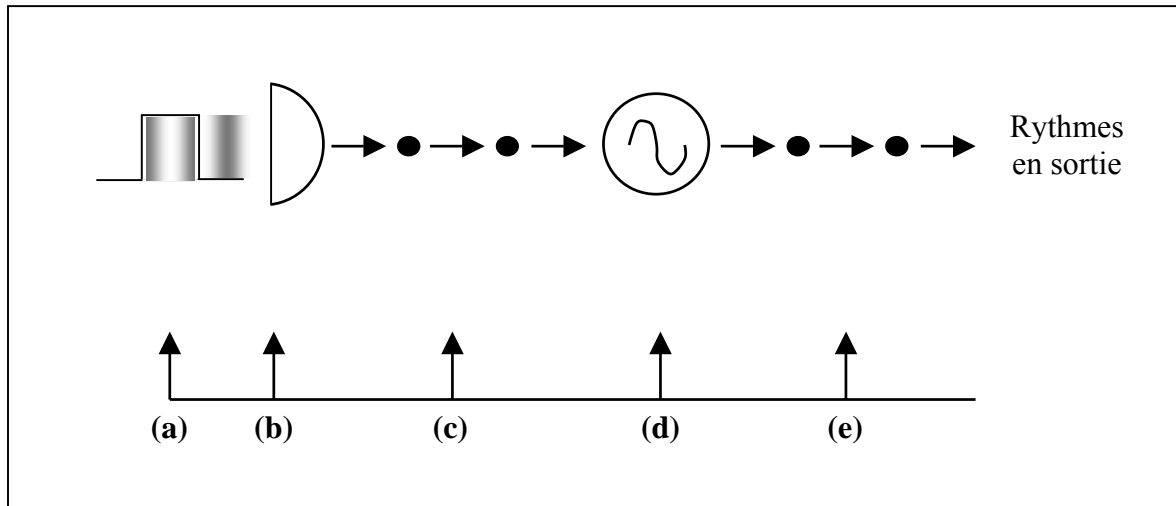


Figure 8 : Schématisation des propriétés d'une horloge à l'échelle de l'organisme.

Pour qu'une structure, représentée en (d), soit qualifiée d'horloge, elle doit être organisée selon un axe bien défini. Les différentes composantes correspondent à (a) des signaux externes perçus par (b) le récepteur ; en (c), ces informations sont transmises par une voie de communication à (d), un générateur de rythmes, nécessaire et suffisant pour générer un rythme auto-entretenu. Ce générateur de rythmes permet ensuite l'existence de rythmes via une transduction de signaux de sortie représentée en (e).

Sur cette figure, la partie (a) correspond à la lumière, (b) à la rétine, (c) est constituée principalement par le tractus rétino-hypothalamique, (d) correspond aux SCN et la partie (e) aux différentes voies de sortie de l'horloge (sécrétion des SCN ou projections nerveuses) permettant l'établissement de rythmes physiologiques et comportementaux .

1.3. FONCTIONNEMENT MOLECULAIRE DE L'HORLOGE.

La compréhension des bases moléculaires de la rythmicité circadienne a connu un formidable essor au cours de ces dix dernières années. Une dizaine de gènes sont impliqués dans la génération et la distribution des messages rythmiques et sont qualifiés de "gènes horloges". Les produits de ces gènes forment des boucles d'autoactivation et d'autoinhibition transcriptionnelles et traductionnelles permettant ainsi la formation de messages rythmiques sur une période d'environ 24h. Ces boucles sont hautement régulées tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-traductionnel. D'autres gènes, les "gènes contrôlés par l'horloge" (CCG, *clock controlled genes*), ont une transcription dépendante des gènes horloges et forment la voie de sortie des messages rythmiques. Les gènes horloges et les CCG sont exprimés aussi bien au sein de l'horloge principale que sont les SCN qu'en périphérie. Les données sur le fonctionnement moléculaire rythmique d'une cellule (génération et régulations) présentées ici regrouperont donc à la fois des résultats obtenus dans des études effectuées au cœur même de l'horloge qu'en périphérie (notamment le foie et les cultures de fibroblastes de Rat-1).

1.3.1. L'horloge moléculaire.

Les interactions entre les produits des gènes horloges permettent l'apparition de trois boucles moléculaires qui sont soit activatrice (une boucle positive) soit inhibitrices (deux boucles négatives) de la transcription. C'est essentiellement à partir de la création d'animaux mutants pour ces gènes, que leur implication dans la rythmicité circadienne, a pu être démontrée et caractérisée. Leurs rôles moléculaires et physiologiques seront présentés en fonction de leur appartenance à l'une ou l'autre des boucles de régulation. Puis, le contrôle des CCG sera abordé.

1.3.1.1. Les gènes horloges.

Une représentation schématique et simplifiée des boucles de régulation est donnée dans la [figure 9](#).



Figure 9: Modèle des boucles moléculaires de régulations transcriptionnelles et traductionnelles des gènes horloges chez les mammifères.

Représentation des événements moléculaires dans une cellule. Se référer au texte pour le détail des étapes des boucles moléculaires et pour les abréviations utilisées.

◆ *La boucle de régulation positive*

Cette boucle de régulation fait intervenir le gène *Clock* ("Circadian locomotor output cycles kaput"). L'expression du gène *Clock* dans les SCN est arythmique en LD comme en DD chez le rat et la souris (Sun *et al.*, 1997 ; Tei *et al.*, 1997 ; Shearman *et al.*, 1997 ; Oishi *et al.*, 1998) mais est rythmique chez le mouton (Lincoln *et al.*, 2002). Sa protéine présente également des niveaux constitutifs dans les SCN chez la souris (Maywood *et al.*, 2003). En revanche, dans le foie, son expression est dépendante du temps (Lee *et al.*, 2001 ; Preitner *et al.*, 2002). Les souris mutantes pour ce gène (*Clock*^{mut}, mutation par délétion, Vitaterna *et al.*, 1994 ; Antoch *et al.*, 1997 ; King *et al.*, 1997) présentent des niveaux faibles d'ARNm de tous les autres gènes horloges montrant ainsi l'implication du gène *Clock* dans la régulation positive de la transcription des gènes horloges (Shearman *et al.*, 2000b ; Kume *et al.*, 1999 ; Jin *et al.*, 1999 ; Oishi *et al.*, 2000). Les souris hétérozygotes présentent une augmentation de la période d'activité locomotrice (Nakamura *et al.*, 2002). Chez les souris homozygotes, l'activité locomotrice est très perturbée. En conditions LD, elles restent plus ou moins rythmiques mais avec une augmentation de l'activité locomotrice de jour. En DD, elles deviennent rapidement arythmiques et enfin, en LL, ces souris présentent une diminution d'activité inférieure à celle des souris sauvages (Vitaterna *et al.*, 1994 ; Antoch *et al.*, 1997 ; Spoelstra *et al.*, 2002). Ceci laisse supposer que l'effet inhibiteur de la lumière chez les rongeurs nocturnes est diminué chez les souris *Clock*^{mut}. Redlin et coll (2005) ont, au cours de la nuit, exposé à la lumière des telles souris mutantes et des souris sauvages. Par rapport à ces dernières servant de contrôle, les souris mutantes ont une inhibition plus faible de l'activité locomotrice. Comme ces souris mutantes présentent une expression de *Mélanopsine* rétinienne normale, les auteurs concluent qu'un dysfonctionnement de l'activité du gène *Clock* entraîne une diminution de la réponse des animaux à la lumière.

Le second gène de cette boucle est le gène *Bmal1* ("Brain and muscle ARN-t like protein 1"). Contrairement au gène précédent, l'expression de *Bmal1* est rythmique, tant au niveau des messagers qu'au niveau protéique, dans les SCN comme en périphérie (Honma *et al.*, 1998b ; Abe *et al.*, 98 ; Oishi *et al.*, 2000 ; Shearman *et al.*, 2000b ; Tamaru *et al.*, 2000). Dans les SCN, les pics de présence d'ARNm et de protéine se situent de nuit. Les mutants de ce gène (*Bmal1*^{-/-}) sont arythmiques en DD et, en LD, la rythmicité est moins marquée avec une activité de jour représentant 21% de l'activité locomotrice totale contre seulement 4% chez les sauvages (Bunger *et al.*, 2000). Les niveaux d'ARNm des autres gènes horloges sont

quasiment nuls chez ces souris mutantes (Bunger *et al.*, 2000). Ces deux paramètres (activité locomotrice et niveaux d'expression des autres gènes horloges) font de *Bmal1* et de *Clock*, des composants essentiels du fonctionnement moléculaire de l'horloge et du comportement circadien de l'animal.

Les deux protéines de la boucle positive appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH ("basic helix loop helix") à domaines PAS ("Period-Arnt-sim") (Hogenesch *et al.*, 1997, 1998 ; King *et al.*, 1997 ; Antoch *et al.*, 1997). Ces séquences permettent la fixation à l'ADN et leur dimérisation, respectivement. Après que ces protéines se soient hétérodimérisées, il en résulte un complexe qui peut reconnaître une séquence particulière de l'ADN appelée E-box, de séquence 5'-CACGTG-3' (Gekakis *et al.*, 1998 ; Hogenesch *et al.*, 1998). Ainsi, les protéines CLOCK et BMAL1 nouvellement formées se dimérisent pour se fixer à l'ADN et provoquer une augmentation de l'activité transcriptionnelle de l'ensemble des autres gènes horloges et des CCG contrôlés par une E-Box ([figure 10, en haut](#), Gekakis *et al.*, 1998 ; Hogenesch *et al.*, 1998). Les séquences bHLH et PAS sont donc essentielles au fonctionnement des dimères CLOCK/BMAL1. Par exemple, le "simple" remplacement d'une arginine du domaine bHLH de BMAL1 par une alanine, une histidine ou encore une tyrosine, n'empêche pas la dimérisation avec CLOCK mais supprime la trans-activation (Hosoda *et al.*, 2004). Le taux de fixation de CLOCK/BMAL1 à l'ADN ne serait pas variable au cours du temps pour certains auteurs (Lee *et al.*, 2001), et pour d'autres il présenterait une rythmicité avec un maximum en fin de nuit (Ripperger & Schibler, 2006).

◆ *Première boucle de régulation négative*

La première boucle négative est constituée par la famille des gènes *Periods* (*Per*) et par des gènes codant des flavoprotéines, les *Cryptochromes* (*Cry*). Trois gènes *Pers* et deux gènes *Crys* sont décrits chez la plupart des mammifères (l'homme présente un quatrième gène *Per*). Les gènes *Pers* sont exprimés aussi bien dans les SCN qu'en périphérie et présentent des valeurs maximales d'ARNm décalées entre-eux dans le temps. En effet le pic d'ARNm de *Per1* se situe vers ZT2-4 alors que celui de *Per2* est vers ZT8-12 et celui de *Per3* vers ZT6-9 (souris : Albrecht *et al.*, 1997 ; Sun *et al.*, 1997 ; Tei *et al.*, 1997 ; Shearman *et al.*, 1997, 2000a, b ; Shigeyoshi *et al.*, 1997 ; Takumi *et al.*, 1998a,b ; Zylka *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 1999 ; Okamura *et al.*, 1999 ; Zheng *et al.*, 1999 ; rat : Yan *et al.*, 1999 ; Miyake *et al.*, 2000 ; Oishi *et al.*, 2000 ; hamster syrien : Maywood *et al.*, 1999 ; Messenger *et al.*, 1999 ; Yamamoto *et al.*, 2001). La construction de souris transgéniques avec le promoteur de *Per1* couplé à la

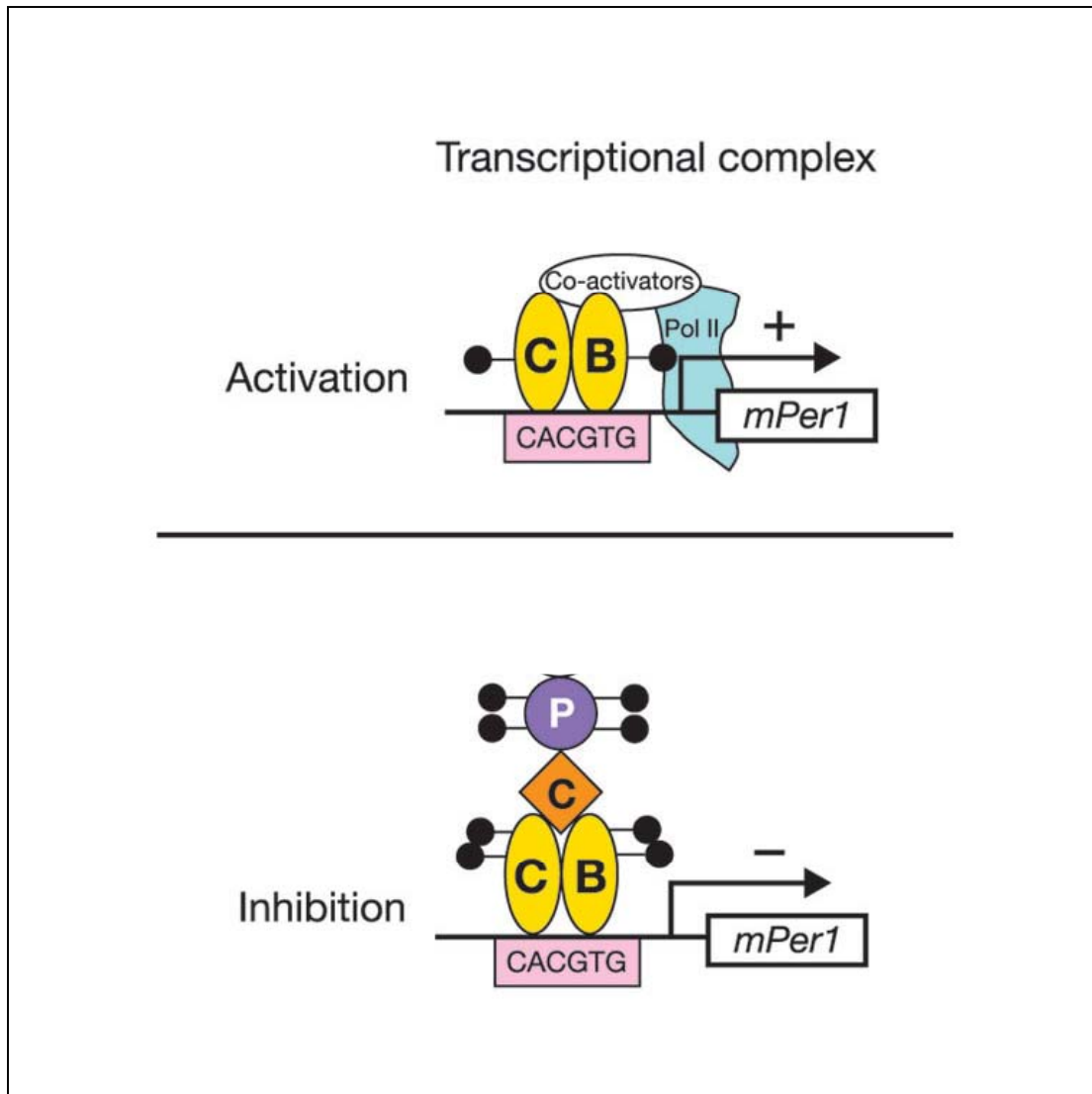


Figure 10 : Activation et inhibition de la transcription des gènes sous dépendance du dimère CLOCK/BMAL1 (d'après Reppert & Weaver, 2002).

En haut est représentée l'activation de la transcription d'un gène présentant une E-box (CACGTG) dans son promoteur, par exemple *Per1*. Les protéines CLOCK (représentées par un C dans un ovale) et BMAL1 (B) se dimérisent et se fixent sur le promoteur via l'E-box ce qui rend possible la transcription après fixation de co-activateurs et de la polymérase II (Pol II). **En bas**, le dimère PERs/CRYs (P, et C dans un losange) inhibe cette activation transcriptionnelle en se fixant sur les dimères CLOCK/BMAL1. Les rond noirs indiquent des phosphorylations.

luciférase (*Per1::LUC*) ont permis de mettre en évidence les variations circadiennes de présence des ARNm de *Per1 in vivo*, en suivant les mêmes animaux tout au long de la journée (Yamaguchi *et al.*, 2000a, 2001 ; Okamura *et al.*, 2002). Les PERs, tout comme CLOCK et BMAL1, sont des protéines à domaines PAS et présentent des maximum de présence, quelques heures après les pics d'ARNm (Hastings *et al.*, 1999 ; Field *et al.*, 2000). Parmi les mutants pour le gène *Per1*, il existe les mutants *Per1^{-/-}* (délétion des exons 4 à 10, Cermakian *et al.*, 2001), les *Per1^{ldc}* (délétion des exons 2 à 12, Bae *et al.*, 2001) et les *Per1^{Brdm}* (délétion des exons 4 à 18, Zheng *et al.*, 2001). Dans les trois cas, les souris présentent une diminution de la période d'activité locomotrice mais seules les souris *Per1^{ldc}* deviennent progressivement arythmiques lorsqu'elles sont placées en DD. Les expressions rythmiques de *Per2*, *Cry1* et *Bmal1* ne sont pas affectées mais, suivant les auteurs, les quantités de PER2 et de CRY1 diminuent (Bae *et al.*, 2001) ou augmentent (Zheng *et al.*, 2001). Pour *Per2*, les mutants *Per2^{Brdm}* (délétion de l'exon 5 et d'une partie du 6, Zheng *et al.*, 1999) et les mutants *Per2^{-/-}* (même site de délétion, Bae *et al.*, 2001) présentent tous une diminution de la période d'activité locomotrice et deviennent arythmiques en DD. Chez ces souris, l'expression de certains gènes horloges est affectée, avec une diminution des niveaux d'ARNm de *Per1*, de *Cry1* et de *Bmal1* sans avoir cependant d'effets sur ceux de *Per3* et de *Clock* (Zheng *et al.*, 1999, 2001 ; Shearman *et al.*, 2000b ; Bae *et al.*, 2001). Les niveaux protéiques de PER1 et CRY1 sont également diminués (Bae *et al.*, 2001). Contrairement aux autres mutants *Pers*, les mutants *Per3^{-/-}* (délétion de l'exon 3 et d'une partie du 4) ne présentent qu'une faible diminution de période d'activité locomotrice et ne deviennent jamais arythmiques en DD (Shearman *et al.*, 2000b ; Bae *et al.*, 2001). De plus les doubles mutants, *Per1^{-/-} Per3^{-/-}* et *Per2^{-/-} Per3^{-/-}* ne présentent pas de différence de comportement plus marquée que les simples mutants *Per1^{-/-}* ou *Per2^{-/-}* alors que les doubles mutants *Per1^{-/-} Per2^{-/-}* deviennent immédiatement arythmiques en DD (Zheng *et al.*, 2001 ; Bae *et al.*, 2001). *Per3* apparaît ainsi comme étant moins essentiel au maintien des comportements circadiens que les deux autres gènes *Pers*, et *Per2* apparaît comme étant le plus important des trois. Les mutations par délétion rapportées ici concernent les deux domaines PAS (A et B) dans le cas des gènes *Per1* et *Per2* et le domaine PAS A dans le cas de *Per3* (voir également Takumi *et al.*, 1998a).

Dans le cas des gènes *Crys*, une expression rythmique de *Cry1* a été décrite avec un pic d'ARNm à la transition jour/nuit chez différentes espèces (Miyamoto & Sancar, 1998 ; Kume *et al.*, 1999 ; Okamura *et al.*, 1999) alors que pour *Cry2*, des différences entre les études réalisées chez une même espèce existent. L'expression de *Cry2* dans les SCN chez la souris

est décrite, soit rythmique avec un pic à la transition jour/nuit (Okamura *et al.*, 1999), soit non rythmique (Miyamoto & Sancar, 1999 ; Kume *et al.*, 1999). Les protéines CRYs présentent des valeurs maximales à la transition jour/nuit (Kume *et al.*, 1999). Les mutants *Cry1^{-/-}* et *Cry2^{-/-}* présentent une diminution ou une augmentation de la période d'activité locomotrice, respectivement, et les doubles mutants *Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}* sont arythmiques (van der Horst *et al.*, 1999). Dans ce dernier cas, il est à noter que chaque cellule des SCN présente une arythmicité pour l'expression de *Per1* (Yamaguchi *et al.*, 2003) tandis que les simples mutants n'ont pas d'effet majeur sur l'expression de *Per1* (Okamura *et al.*, 1999).

Les protéines PER et CRY forment des complexes PER_{1,2,3}/CRY_{1,2} qui pourront pénétrer dans le noyau (pour revue Reppert & Weaver, 2002) où ils peuvent inhiber leur propre transcription en diminuant la transactivation due à CLOCK/BMAL1 (voir [figure 10, en bas](#)). La formation de différents hétérodimères PERs/CRYs est possible (Kume *et al.*, 1999) mais comme les doubles mutants *Per2^{-/-} Cry2^{-/-}* sont rythmiques (Oster *et al.*, 2002) alors que les simples mutants *Per2^{-/-}* sont arythmiques, il est possible que des dimères préférentiels PER2/CRY2 et PER1/CRY1 se forment.

Ainsi, les *Pers* et les *Crys* jouent un rôle similaire d'un point de vue de l'activation transcriptionnelle des gènes sous contrôle des dimères CLOCK/BMAL1 mais ils ne doivent pas pour autant être considérés ensemble. En effet, le contrôle de leur propre expression est différent. Par exemple, dans le cas où les animaux subissent une avance de phase du cycle LD de 6h, les pics d'ARNm de *Per1* et de *Per2* montrent une expression déjà changée dès le premier jour, notamment dans la partie vlSCN, et, dès le troisième jour, les variations journalières des quantités d'ARNm correspondent au nouveau cycle LD. Au contraire, trois jours après le changement, l'expression de *Cry1* n'est plus en phase avec l'ancien cycle LD mais n'est toujours pas en phase avec le nouveau cycle. Huit jours semblent nécessaires à la re-synchronisation du pic d'ARNm de *Cry1* (Reddy *et al.*, 2002).

◆ *Seconde boucle de régulation négative*

La démonstration de la présence d'une seconde boucle négative est plus récente que celle des autres boucles. Certains résultats laissent déjà supposer son existence en montrant que PER2, en plus de l'inhibition de sa propre transcription, pourrait activer celle de *Bmal1* (Shearman *et al.*, 2000a ; Yu *et al.*, 2002). Cet effet n'est pas direct et fait intervenir le gène *Rev-erba* (voir [figure 9](#)). La transcription de *Rev-erba* est augmentée par le dimère CLOCK/BMAL1 et en retour, REV-ERB α inhibe celle de *Bmal1* par l'intermédiaire des

séquences ROREs ("REV-ERB α / ROR Response element") situées sur le promoteur de *Bmal1* (Preitner *et al.*, 2002 ; Ueda *et al.*, 2002). Nous avons vu précédemment que les hétérodimères PERs/CRYs inhibent la trans-activation due à CLOCK/BMAL1 donc aussi celle de *Rev-erb α* . Ainsi, PER2 active indirectement la transcription de *Bmal1*, en inhibant celle de *Rev-erb α* , ce qui diminue les quantités de REV-ERB α qui, elle, inhibe la transcription de *Bmal1*. En quelque sorte, il y a une levée d'inhibition de la transcription de *Bmal1*. Des mutants murins pour *Rev-erb α* ont également été réalisés, ceux-ci présentent une diminution de la période d'activité locomotrice, et, les conséquences pour l'expression des autres gènes horloges sont une diminution de l'amplitude du rythme de *Bmal1* (par augmentation des valeurs basales), une augmentation de la durée du pic de *Cry1* et aucun effet sur les pics de *Per2* et de *Cry2* (Preitner *et al.*, 2002).

◆ *Interactions entre les différents acteurs des boucles*

En résumé de cette description des principaux acteurs moléculaires, le fonctionnement nyctéméral des boucles suivrait le schéma temporel suivant : en début de jour, les dimères CLOCK/BMAL1 présentent leur niveau de fixation maximale à l'ADN et entraînent ainsi la transcription des gènes *Per1* et *Rev-erb α* , puis *Per3*, puis *Per2* et, en fin de jour, celles de *Cry1* et de *Cry2*. Les protéines formées s'accumulent dans le cytoplasme et peuvent être phosphorylées, par la caséine kinase I $_e$ ce qui entraîne leur dégradation (Lowrey *et al.*, 2000 ; Takano *et al.*, 2000 ; Keesler *et al.*, 2000 ; Vielhaber *et al.*, 2000 ; Camacho *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2001, 2004 ; Eide *et al.*, 2002, 2005 ; Miyazaki *et al.*, 2004). Les séquences temporelles des localisations nucléocytoplasmiques précises des protéines horloges sont assez controversées (voir [chapitre A.1.3.2.1.](#)) mais, il semble clair que, suite à leur hétérodimérisation, les complexes PERs/CRYs pénètrent dans le noyau. Le mécanisme d'entrée dans le noyau est encore peu connu mais pourrait faire intervenir des importines α au moins pour CRY2 (Sakakida *et al.*, 2005). Une fois dans le noyau, les protéines horloges de la première boucle négative inhibent leur propre transcription en bloquant l'action des dimères CLOCK/BMAL1. On peut dire que les dimères CLOCK/BMAL1 sont activateurs de la transcription mais que les trimères CLOCK/BMAL1/CRY1 en sont inhibiteurs (Kondratov *et al.*, 2006). Cet effet d'inhibition paraît d'ailleurs être essentiel au bon fonctionnement circadien. De plus, REV-ERB α amplifie cet effet, en diminuant de jour, les quantités d'ARNm de *Bmal1*. En fin de nuit, les gènes horloges des deux boucles négatives présentent

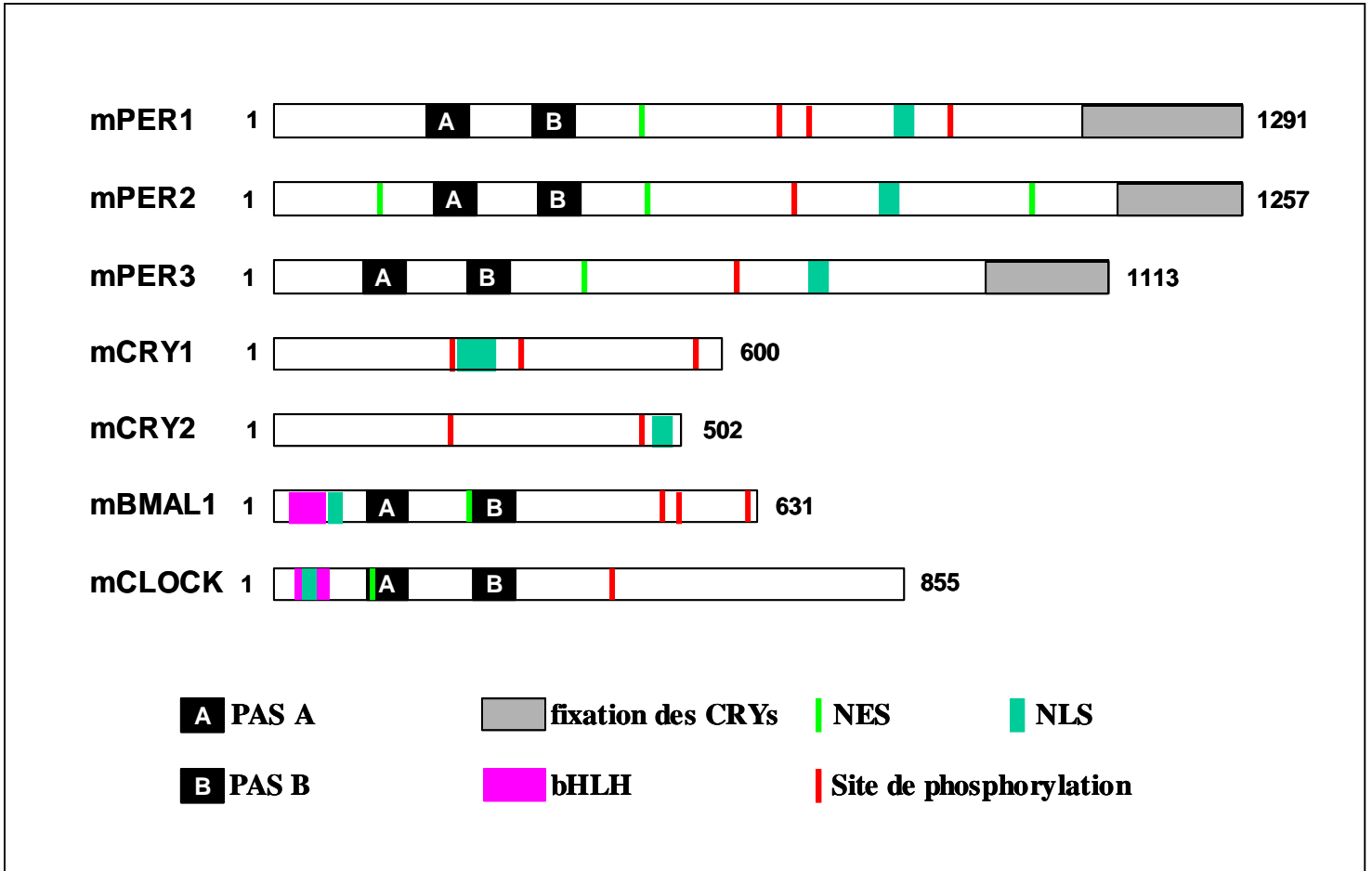


Figure 11 : Représentation schématique des protéines horloges et de leurs différents domaines (modifié d'après Hirayama & Sassone-Corsi, 2005).

Différentes protéines horloges sont représentées avec leurs domaines d'interactions (PAS A, PAS B, et sites de fixation des CRYs pour les PERs). Les séquences d'adressage de localisation nucléaire (NLS) et cytoplasmique (NES) sont indiqués ainsi que les sites de phosphorylation. Dans le cas de CLOCK et de BMAL1, la séquence bHLH, permettant l'interaction avec l'ADN est également localisée. bHLH, basic helix loop helix ; PAS, Period-Arnt-sim.

leurs valeurs minimales d'ARNm, *Bmal1* et CLOCK/BMAL1 ne sont plus inhibés...un nouveau cycle recommence.

Une représentation schématique d'une partie des protéines horloges est donnée [figure 11](#). Sur cette représentation, nous pouvons remarquer que ces protéines possèdent, pour la majeure partie d'entre-elles, une séquence de localisation nucléaire et une séquence de localisation cytosolique. Différents sites de phosphorylation sont également indiqués et correspondent à l'action, de diverses kinases, qui sera détaillée au [chapitre A.1.3.2.4.](#)

1.3.1.2. Les gènes contrôlés par l'horloge.

Potentiellement, tous les gènes sous dépendance promotrice d'une ou plusieurs E-box, peuvent être considérés comme des CCG. Toutefois, dans les SCN, bien que la transcription de nombreux gènes soit contrôlée par l'horloge (Duffield, 2003), très peu de gènes ont été étudiés en détails. Il s'agit de l'*Avp*, de *Dbp* ("Albumin gene D-site binding protein") et de *Pk2*. Tous les trois possèdent des E-box dans leur promoteur et la présence de leurs ARNm est rythmique dans les SCN, et dans le foie pour *Dbp* (Wuarin & Schibler, 1990 ; Jin *et al.*, 1999 ; Yamaguchi *et al.*, 2000b ; Cheng *et al.*, 2002, 2005). *In vitro*, une mutation de l'E-box dans le promoteur de l'*Avp* entraîne une disparition de sa transactivation par CLOCK/BMAL1 (Jin *et al.*, 1999) et les souris mutantes *Bmal1*^{-/-} ou *Clock*^{mut} ont leurs niveaux d'ARNm d'*Avp* et de *Dbp* réduits (Silver *et al.*, 1999 ; Bunker *et al.*, 2000) confirmant ainsi leur nom de CCG.

Ainsi, la figure 8 présentée au niveau de l'organisme entier au [chapitre A.1.2.](#), peut trouver cette fois une signification au niveau cellulaire. Sur la [figure 12](#) (identique en forme aux figures 2 et 8), le "récepteur" correspond cette fois aux récepteurs cellulaires, le "générateur de rythmes" aux boucles de régulations et la partie "transduction des signaux de sortie" aux gènes contrôlés par l'horloge.

1.3.1.3. Gènes horloges, activité électrique, VIP & AVP.

Au sein des SCN, la majorité des neurones présente (a) une activité rythmique (voir [paragraphe A.1.2.3.](#)), (b) une expression de l'un des deux neuropeptides majeurs, l'AVP et le VIP (voir [paragraphe A.1.2.2.](#)) et (c) une expression circadienne des gènes horloges (voir [paragraphe A.1.3.1.1.](#)). Aussi, plusieurs questions se posent : quels sont les liens entre ces différentes caractéristiques ? Autrement dit, le contenu neuropeptidergique influe-t-il sur l'expression des gènes horloges ? et les rythmes d'activité électrique des neurones contribuent-ils aux boucles moléculaires ?

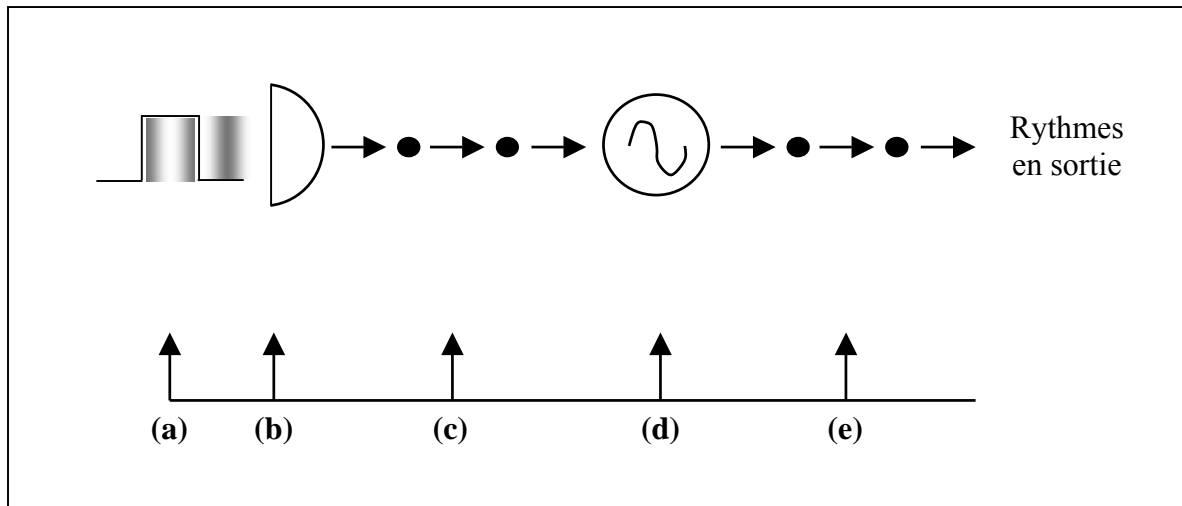


Figure 12 : Schématisation des propriétés d'une horloge à l'échelle de la cellule.

Pour qu'une structure, représentée en (d), soit qualifiée d'horloge, elle doit être organisée selon un axe bien défini. Les différentes composantes correspondent à (a) des signaux externes perçus par (b) le récepteur ; en (c), ces informations sont transmises par une voie de communication à (d), un générateur de rythmes, nécessaire et suffisant pour générer un rythme auto-entretenu. Ce générateur de rythmes permet ensuite l'existence de rythmes via une transduction de signaux de sortie représentée en (e).

Sur cette figure, la partie (a) correspond aux diverses molécules se fixant sur la partie (b), les récepteurs cellulaires. La partie (c) est constituée par les voies de signalisation intracellulaires, les boucles de régulations forment la partie (d) et la partie (e) correspond aux gènes contrôlés par l'horloge.

◆ *Influence des neuropeptides*

Chez les mutants *Vip*^{-/-}, le nombre de cellules restant rythmiques pour l'expression de *Per1* (*Per1::LUC* mesuré en images en temps réel) est plus important dans la région dmSCN que vlSCN ce qui suppose que la capacité d'autorythmie d'une cellule est plus marquée dans les cellules à AVP qu'à VIP (Maywood *et al.*, 2006). Le VIP agit sur ses cibles via deux récepteurs, le PAC₁ et le VPAC₂. Seul ce dernier semble jouer un rôle prépondérant dans les rythmes circadiens. En effet, l'application d'antagoniste du VPAC₂ bloque l'activité électrique des SCN (Cutler *et al.*, 2003) et l'application d'agoniste du VPAC₂ provoque les mêmes effets sur l'activité électrique que le VIP (Reed *et al.*, 2002). Une mutation du gène *Vrp2* (codant pour le récepteur VPAC₂) induit chez les souris mutantes une arythmie de l'activité locomotrice en conditions LD ou après transfert en DD (Harmar *et al.*, 2002 ; Cutler *et al.*, 2003 ; Aton *et al.*, 2005). Des hybridations *in situ* dirigées contre les ARNm des gènes horloges ou le suivi de la présence des ARNm de *Per1* chez des souris transgéniques (avec le promoteur de *Per1* couplé à la luciférase ou à la GFP, "Green fluorescent protein") ont mis en évidence que les oscillations de tous les gènes horloges étudiés sont plus faibles (Harmar *et al.*, 2002 ; Cutler *et al.*, 2003 ; Aton *et al.*, 2005 ; Maywood *et al.*, 2006). Cet effet semble spécifique des SCN car dans le cortex moteur comme dans le striatum, l'expression de *Per2* reste inchangée (Harmar *et al.*, 2002). Dans le but de déterminer si les propriétés oscillantes de chaque cellule étaient affectées ou si seule la synchronisation des pics de décharge et d'expression des gènes horloges des neurones était modifiée, des enregistrements d'une résolution cellulaire ont pu être effectués grâce à une caméra CCD ("Computer-controlled digital video"). Celle-ci a permis de mettre en évidence que chaque cellule des SCN présente une activité moindre et se désynchronise des autres cellules (Quintero *et al.*, 2003 ; Yamaguchi *et al.*, 2003 ; Maywood *et al.*, 2006). Les régions dmSCN et vlSCN ayant été séparées puis mises en cultures en tranches ont montré que les neurones à VIP restent synchronisés ensemble tandis que les neurones à AVP présentent d'importants décalages de phase entre eux (voir [figure 13](#), Yamaguchi *et al.*, 2003). De plus, au cours d'un cycle de 24h, les pics d'ARNm de *Per1* et de *Per2* ont lieu tout d'abord dans la dmSCN puis dans la vlSCN (Yan *et al.*, 1999 ; Yamaguchi *et al.*, 2003 ; Hamada *et al.*, 2004). **Ainsi, le VIP permettrait l'établissement des propriétés d'oscillations d'une partie des cellules des SCN et une synchronisation des cellules des SCN, permettant la formation d'un message rythmique global. Les neurones à AVP possèderaient les propriétés d'autorythmie les plus stables et seraient synchronisés par les neurones à VIP.** La présence du VIP influe donc sur

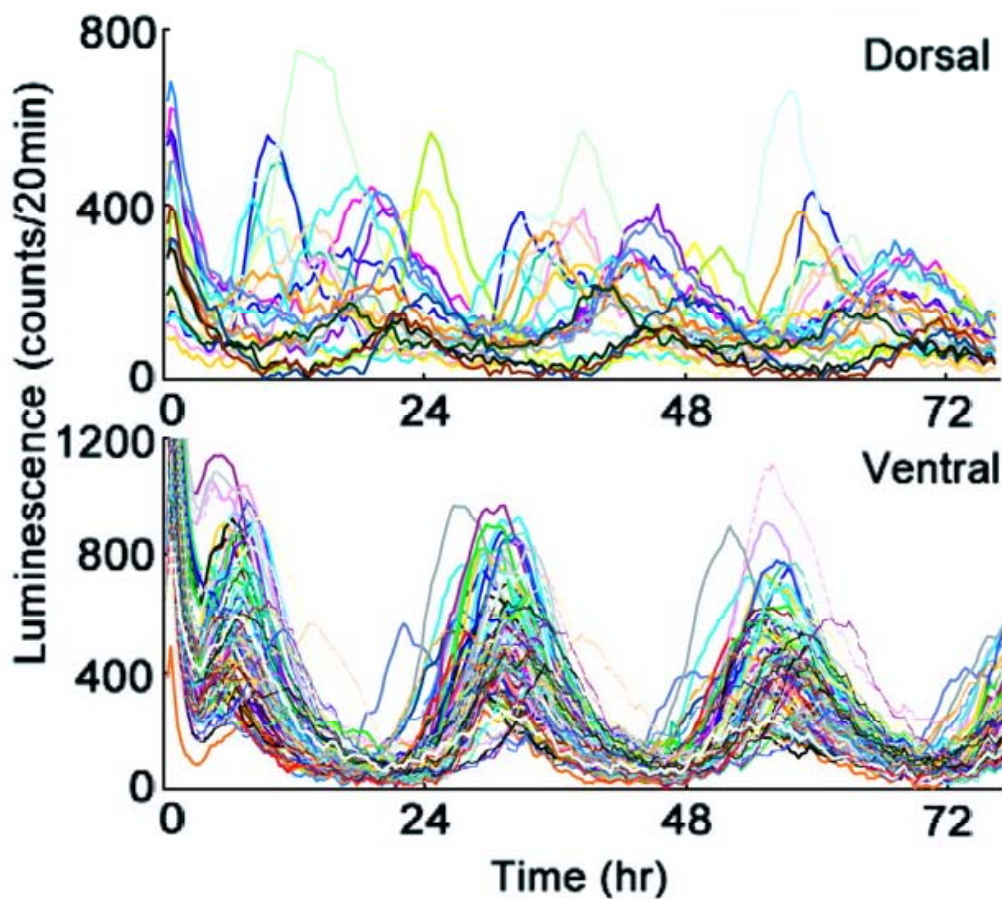
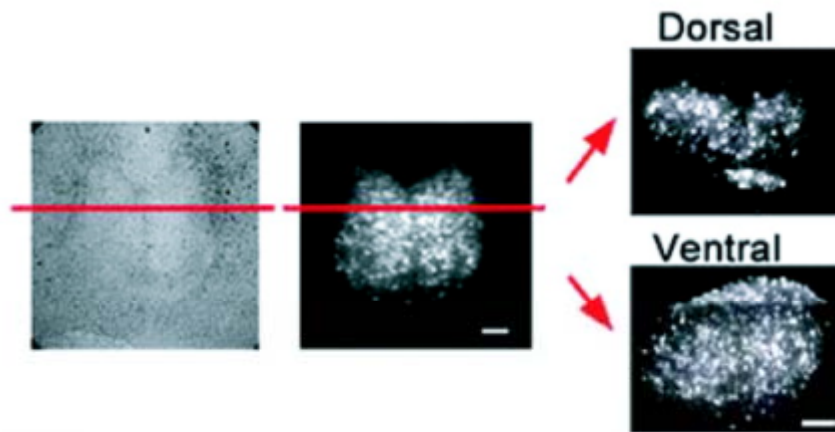


Figure 13 : Enregistrement de la luminescence d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *Per1*, sur les parties ventrale et dorsale de tranches de SCN (d'après Yamaguchi et al., 2003).

En haut : Représentation d'une tranche de SCN complète puis après section dans le premier tiers supérieur de la tranche. **En bas** : Variations des taux de luminescence de *Per1::luc* dans les parties dorsale et ventrale des SCN. Chaque couleur représente une cellule.

l'expression des gènes horloges et il est à noter que, chez la souris, le gène *Clock* intervient dans le contrôle de l'expression du VIP et de l'AVP au cours du développement post-natal (Herzog *et al.*, 2000).

Bien qu'il n'y ait pas encore de lien direct entre l'expression de la CALB dans certains neurones et l'absence de rythmicité d'expression de *Per1* et de l'activité électrique dans ces neurones (Honma *et al.*, 1998a ; Jobst & Allen, 2002 ; Hamada *et al.*, 2001), il est probable que la CALB influe sur l'expression des gènes horloges.

◆ *Influence de l'activité électrique*

Chez les mutants hétérozygotes pour le gène *Clock*, la période d'activité électrique de chaque cellule augmente, induisant ainsi une période comportementale supérieure à 24h. Chez les mutants homozygotes, les animaux sont arythmiques ce qui est corrélé à une perte d'activité rythmique de nombreuses cellules des SCN (Herzog *et al.*, 1998 ; Nakamura *et al.*, 2002). Cette démonstration de corrélation entre gènes horloges et activité électrique cellulaire a été confirmée chez les mutants murins *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (Albus *et al.*, 2002) et chez le mutant *tau* (Davies & Mason, 1994 ; Liu *et al.*, 1997b).

Par application de TTX sur des tranches de SCN en culture, les rythmes de *Per1::LUC* persistent mais avec une augmentation des décalages de phase entre les cellules et une diminution de l'amplitude des oscillations individuelles pratiquement jusqu'à l'obtention d'une arythmie (Yamaguchi *et al.*, 2003). De plus, une diminution de K^+ ou de Ca^{++} externe réduit ou abolit de manière réversible, l'expression cyclique de *Per1::LUC* et de *PER2::LUC* (protéine de fusion réalisée à partir des 23 exons de la séquence codant PER2, auxquels sont ajoutés la séquence codant la LUC, voir Yoo *et al.*, 2004) dans les SCN comme dans le foie (Lundkvist *et al.*, 2005 ; Maywood *et al.*, 2005) montrant ainsi que l'état électrique des cellules influe sur les oscillations des produits des gènes horloges. De plus, chez les mutants *Vipr2^{-/-}*, une application de K^+ sur des tranches de SCN permet une synchronisation transitoire des décharges des neurones qui est dépendante de la présence de Ca^{++} . Le Ca^{++} (d'origine interne et externe aux cellules) est donc nécessaire à la formation des rythmes d'expression des gènes horloges (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002 ; Lundkvist *et al.*, 2005). **Les canaux Na^+ sensibles au TTX comme la présence de Ca^{++} sont nécessaires à l'expression des gènes horloges et à la synchronisation des cellules entre elles.**

En conclusion, l'expression des gènes horloges est régulée différemment entre les deux subdivisions principales, vlSCN et dmSCN. Les gènes horloges, ou au moins une partie d'entre eux, ont une influence sur l'expression des neuropeptides et sur l'activité électrique. En retour, les neuropeptides libérés tout comme l'activité électrique, permettent de réguler l'expression des gènes horloges (pour revue, Hastings & Herzog, 2004 ; Aton & Herzog, 2005).

1.3.2. Des niveaux de régulations.

Le modèle couramment accepté de boucles de régulation (voir [figure 9](#)) suggère que l'activation de l'expression des gènes intervienne à travers l'action du dimère CLOCK/BMAL1 au niveau de leur région promotrice. Cependant, ce modèle de régulation ne peut être effectif que dans les cas où les gènes cibles sont sous le contrôle exclusif de CLOCK/BMAL1 et, de ce fait, lorsque leur activité basale, en l'absence de ce dimère, est faible ou nulle. En réalité, la région promotrice des gènes cibles du dimère activateur contient de multiples autres sites pour d'autres facteurs de transcription qui pourraient également participer à la régulation de l'activité transcriptionnelle. Ainsi, en plus des contrôles et rétrocontrôles par les produits des gènes horloges, de nombreux autres acteurs interviennent. De nombreuses études de la régulation de l'expression des gènes horloges ont montré des **régulations géniques** comme la régulation de la forme de la chromatine par phosphorylation des histones, des **régulations transcriptionnelles**, avec par exemple des *enhancers* et des *silencers* régulant l'activité transcriptionnelle ou encore par **régulations post-traductionnelles** comme les phosphorylations des protéines horloges, leurs dégradations spécifiques et la formation de dimères (pour revues Reppert & Weaver, 2002 ; Lowrey & Takahashi, 2004). Ces différentes régulations permettent un contrôle précis de l'équilibre synthèse/dégradation des protéines/ARNm, formant "l'équilibre dynamique des constituants de la matière vivante" (Schoenheimer, 1942) et, dans notre cas précis, l'équilibre entre les voies activatrices/inhibitrices des boucles moléculaires permettant l'activation ou l'inhibition des CCG. Nous nous intéresserons ici à présenter ces différents niveaux de régulation.

1.3.2.1. Régulation Transcriptionnelle.

La régulation des quantités d'ARNm de *Per* par l'activité transcriptionnelle, a été mise en évidence chez la drosophile avant même que l'on identifie les principaux acteurs (Hao *et al.*,

1997). La découverte de CLOCK et BMAL1 et de leur action par l'intermédiaire d'une E-box sur l'activation de la transcription de *Per1* (Gekakis *et al.*, 1998 ; Hogenesch *et al.*, 1998) a permis d'établir le premier modèle de régulation de la transcription des gènes horloges. Depuis, d'autres facteurs activateurs ou inhibiteurs ont été mis en évidence.

◆ *De l'importance des histones*

Les histones font partie des protéines qui possèdent les domaines les plus conservés entre espèces (van Holde *et al.*, 1988). Une unité nucléosomale est formée de différentes histones nommées H2_A, H2_B, H3 et H4 (Kornberg, 1974) et permet principalement par changement de conformation, de réguler l'accès à la chromatine et donc la transcription (pour revue, Workman & Kingston, 1998). Cependant, à l'heure actuelle, seules les histones H3 et H4 semblent avoir un rôle dans la régulation de la transcription de gènes horloges. Parmi les modifications possibles des histones (Strahl & Allis, 2000), H3 subit une phosphorylation et une méthylation et, comme H4, une acétylation, qui conduisent toutes à une augmentation de l'activité transcriptionnelle. Les mécanismes intervenant dans le contrôle de l'activité de H3 sont ici et sont schématisés [figure 14](#).

La phosphorylation de H3 en Ser10, en réponse à un stimulus, s'effectue à une vitesse comparable à celle de l'induction des IEG ("Immediated early genes") et fait intervenir la voie des MAP kinases et plus particulièrement des kinases MSK-1 ("MAP- and stress-activated kinase-1") et RSK-2 ("Ribosomal protein S6 kinase-2", Thomson *et al.*, 1999 ; Sassone-Corsi *et al.*, 1999). La forme phosphorylée de l'histone H3 permet une augmentation de l'activité transcriptionnelle mais son mode d'action reste inconnu. L'une des hypothèses est que la phosphorylation de H3 permet un apport supplémentaire en charges négatives en N-ter ce qui modifierait les interactions électrostatiques avec l'ADN (chargé négativement) permettant alors un éloignement de H3 et donc une facilité d'accès pour les facteurs de transcription (Cheung *et al.*, 2000a). Cependant, selon les auteurs, les avis divergent quant à l'existence (Etchegaray *et al.*, 2003) ou non (Crosio *et al.*, 2000) d'un rythme de phosphorylation de l'histone H3. De nouvelles expériences sont nécessaires pour comprendre plus précisément quel est le rôle de la phosphorylation de H3 sur l'expression des gènes horloges. Néanmoins, il apparaît que les histones acétyltransférases (HATs) ont une interaction préférentielle avec H3 phosphorylée (Cheung *et al.*, 2000b ; Lo *et al.*, 2000) et permettent son acétylation.

Les HATs permettent une variation circadienne de l'acétylation des histones au niveau des promoteurs de *Per1* (H3 et H4) et de *Per2* (H3) avec un pic en phase avec les pics d'ARNm de ces gènes (Etchegaray *et al.*, 2003 ; Curtis *et al.*, 2004 ; Naruse *et al.*, 2004). Deux

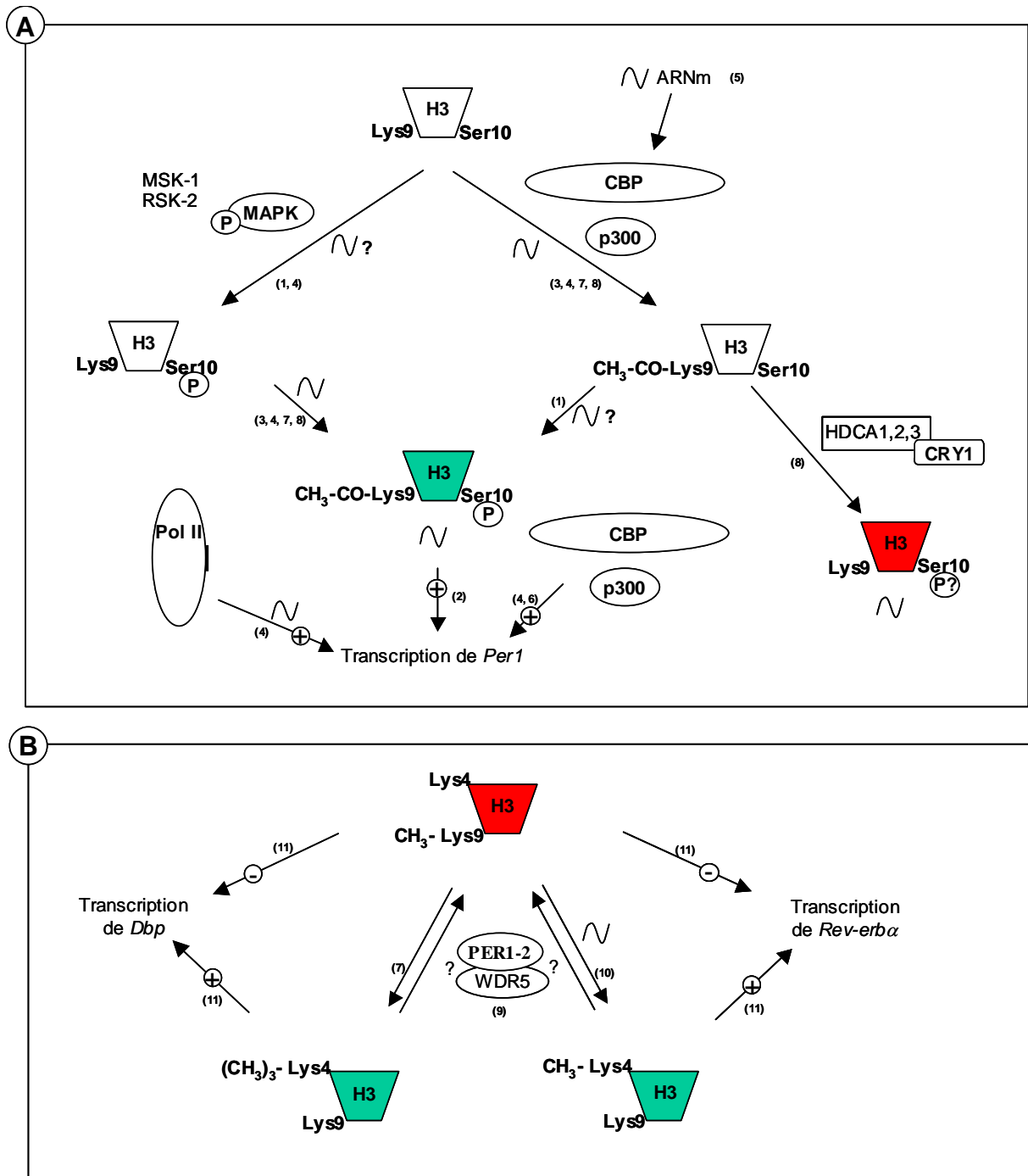


Figure 14 : Régulations de l'activité de l'histone H3 par phosphorylation, acétylation et méthylation.

Synthèse des modes de régulation de l'activité de l'histone H3 par phosphorylation et acétylation (A) et par méthylation (B). CBP, CREB binding protein; HDAC, histones déacétylases; Lys, Lysine (K dans le texte); MSK-1, MAP and stress-activated kinase-1; NONO, Non-POU-domain-containing octamer-binding protein; RSK-2, Ribosomal protein S6 kinase-2; Ser, Sérine (S dans le texte); WDR5, WD40-repeat protein 5. Pour plus d'explications, se référer au texte.

(1) Thomson *et al.*, 1999; Sassone-Corsi *et al.*, 1999; Crosio *et al.*, 2000; (2) Cheung *et al.*, 2000a; (3) Cheung *et al.*, 2000b; Lo *et al.*, 2000; Curtis *et al.*, 2004; (4) Etchegaray *et al.*, 2003; (5) Fiore & Gannon, 2003; (6) Takahata *et al.*, 2000; (7) Ripperger & Schibler, 2006; (8) Naruse *et al.*, 2004; (9) Wysocka *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; (10) Brown *et al.*, 2005; (11) Lachner & Jenuwein, 2002; Santos-Rosa *et al.*, 2002.

protéines possédant une activité HAT intrinsèque semblent intervenir dans le contrôle de la transcription de gènes horloges : CBP ("CREB binding protein") et p300. Elles présentent toutes deux des variations circadiennes d'expression mais avec une amplitude d'oscillation faible, 20%, entre le milieu de jour et le milieu de nuit (Fiore & Gannon, 2003) et semblent interagir avec BMAL1 par leur site de fixation de CREB pour augmenter l'activité transcriptionnelle (Takahata *et al.*, 2000). Par contre, seule p300 co-précipite avec CLOCK avec une diminution de la quantité de complexes p300-CLOCK de cinq fois entre CT6 (milieu de jour) et CT18 (milieu de nuit) ce qui pourrait être en partie à l'origine de la diminution d'acétylation de H3 et donc de la diminution de l'activité transcriptionnelle. De plus, *in vitro*, la transactivation médiée par CLOCK/BMAL1 est induite de façon dose dépendante par p300 mais est diminuée de 80% en présence de CRY1 ou de CRY2 (Etchegaray *et al.*, 2003). Lorsque la transcription de *Dbp* est active, l'histone H3 présente en lysine 9 (H3_{K9}) une acétylation et une diméthylation lorsque CLOCK/BMAL1 n'est plus fixé au promoteur et que la transcription est de ce fait inactivée (Ripperger & Schibler, 2006). Les HDAC ("Histones déacétylases") provoquent l'effet inverse de celui des HATs et ne présentent pas d'activité cyclique mais trois d'entre-elles (HDAC1,2,3) forment un complexe avec CRY, avec un minimum de fixation sur le promoteur de *Per1*, en fin de nuit et début de jour (Naruse *et al.*, 2004). Enfin, la fixation de la polymérase II sur les promoteurs de *Per1* et *Per2* présente également des variations circadiennes, en phase avec le pic d'acétylation de H3 (Etchegaray *et al.*, 2003).

L'étude de la phosphorylation et de l'acétylation des histones ([figure 14A](#)) n'a porté jusqu'à présent que sur les promoteurs de *Per1*, *Per2* et *Dbp*. A l'inverse, l'étude de la méthylation de H3 ([figure 14B](#)) concerne essentiellement la régulation de *Rev-erba*. Par co-précipitation avec PER1 et PER2, deux facteurs ont été mis en évidence : NONO ("Non-POU-domain-containing, octamer-binding protein", faisant partie des "Rna and Dna Binding Protein") et WDR5 ("WD40-repeat protein 5", avec W pour le tryptophane et D pour l'aspartate) (Brown *et al.*, 2005). Ils sont non rythmiques et peuvent intervenir respectivement dans la répression de la transcription et dans la méthylation des histones (Shav-Tal & Zipori, 2002 ; Wysocka *et al.*, 2003). A partir de cultures cellulaires, Brown et coll. (2005) montrent que la méthylation de H3 sur sa lysine 4 (H3_{K4}) au niveau du promoteur de *Rev-erba* est rythmique, en phase avec la transcription de *Rev-erba* et en opposition de phase avec la méthylation de H3 sur sa lysine9 (H3_{K9}). Il a été montré que H3_{K4} et H3_{K9} ont des effets respectivement activateurs et répresseurs de la transcription (Lachner & Jenuwein, 2002 ; Santos-Rosa *et al.*, 2002) et

pourraient alors participer au contrôle de la transcription de *Rev-erba*. Quant à NONO, son inhibition par SiRNA ("Small interfering RNA") permet d'augmenter les niveaux d'ARNm de *Bmal1* et de diminuer ceux de *Rev-erba*. Des études complémentaires seront nécessaires pour préciser le rôle de WDR5 et de NONO en particulier dans leur possible compétition pour activer/inhiber *Rev-erba*. Des résultats récents confirment le rôle de la méthylation en H3_{K4} dans le cas du gène *Dbp*. En effet, lorsque sa transcription est active, H3_{K4} présente une triméthylation (Ripperger & Schibler, 2006).

◆ *E-box Element*

Nous avons vu précédemment (paragraphe A.1.3.1.1.) que la présence d'E-box permet au dimère CLOCK/BMAL1 de se fixer et d'activer la transcription. Ainsi, plusieurs groupes de recherche ont tenté de déterminer quels gènes possèdent des E-box et surtout quelles en sont les conséquences. Les gènes de la boucle positive, *Clock* et *Bmal1*, en sont dépourvus, et n'agissent donc pas (directement) sur leur propre transcription. En revanche, dans les promoteurs des gènes des boucles négatives, plusieurs E-box ont été mises en évidence. Des divergences existent cependant entre les études. Pour certains auteurs, le promoteur murin de *Per1* possède au total 3 E-box (Gekakis *et al.*, 1998 ; Travnickova-Bendova *et al.*, 2002) alors que pour d'autres, 2 E-box supplémentaires ont été décrites, plus éloignées encore du site d'initiation de la transcription (Hida *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2000a). *In vitro*, par rapporteur luciférase, une activation de la transcription de *Per1* apparaît proportionnelle au nombre d'E-box présentes (Hida *et al.*, 2000). Mais, *in vivo*, ces 5 E-box permettent la présence d'un épissage alternatif de *Per1* au niveau de son premier exon : l'exon 1_A serait précédé de 2 E-box et le 1_B des 3 autres. Il en résulterait la formation de deux types d'ARNm de *Per1*, présentant tous deux un pic à CT4 (Yamaguchi *et al.*, 2000a). Le rôle de cet épissage alternatif n'est pas encore connu mais il est à noter que l'exon 1 avec une partie de l'exon 2 constitue l'UTR 5' ("Untranslated region 5'") (Hida *et al.*, 2000). Toujours chez la souris, dans le cas de *Per2*, la transactivation due au dimère CLOCK/BMAL1 ferait intervenir un nombre différent d'E-box et d'E-box like selon les études : 7 E-box like (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002), 1 E-box et 5 E-box like (Yoo *et al.*, 2005) ou même une seule 1 E-box like (Akashi *et al.*, 2006) ont été décrites. Il est intéressant de noter que seule l'E-box like, en position -20, décrite par Yoo et coll. (2005), intervient dans le contrôle de la transcription de *Per2*. Si l'équipe d'Akashi et coll. ne démontre la présence que d'une seule E-box like, il est intéressant de noter qu'elle se situe... entre -25 et -6. Pour le gène *mPer3*, soit 4 E-box ont été trouvées (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002) soit aucune (Yamamoto *et al.*, 2004).

D'autres études sont nécessaires afin de vérifier la présence des E-box et de préciser leur rôle. Cependant, la présence d'E-box dans le promoteur d'un gène ne semble pas être la seule condition nécessaire à l'apparition cyclique des ARNm des gènes horloges (Akashi *et al.*, 2006) et n'est pas toujours la condition suffisante pour obtenir des variations cycliques des taux d'ARNm (Munoz *et al.*, 2002). En effet, dans le cas de *Rev-erb α* où 5 E-box semblent être présentes chez la souris (Yamamoto *et al.*, 2004), et 3 E-box like en sus chez le rat (Triqueneaux *et al.*, 2004) seule une partie d'entre elles interviennent dans le contrôle de la transcription par CLOCK/BMAL1 alors que toutes fixent ce complexe (Triqueneaux *et al.*, 2004).

◆ *cAMP Response Element*

La présence de la séquence cAMP Response Element (CRE) 5'-TGACGTCA-3' (Gonzalez *et al.*, 1989) a été mise en évidence dans les promoteurs des gènes *Per1* et *Per2* mais pas dans celui de *Per3* (Hida *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2000a ; Travnickova-Bendova *et al.*, 2002) ni de *l'Avp* (Iwasaki *et al.*, 1997). *In vitro*, la présence de CREB ("CRE binding protein") permet une augmentation de la transcription par la séquence CRE du promoteur (Iwasaki *et al.*, 1997). Cette transactivation nécessiterait la formation d'un complexe entre CREB, CBP et p300 (Kwok *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1996 ; De Cesare & Sassone-Corsi, 2000). L'action de CREB sur CRE a été vérifiée *in vitro*, par l'application d'oligonucléotides dirigés contre la séquence CRE (Tischkau *et al.*, 2003a) et en cultures de cellules SCN2.2, par mutation de cette séquence (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). Dans les SCN, alors que la quantité de CREB et la fixation de CREB sur CRE semblent être indépendantes du temps, l'activation par phosphorylation de CREB présente des variations circadiennes avec un pic à CT6 (Obrietan *et al.*, 1999). Cette activation de la transcription de *Per1* et de *Per2* par la voie cAMP – CREB semble être indépendante de la voie CLOCK/BMAL1. Les deux voies interviendraient séparément et sans s'affecter l'une et l'autre.

◆ *REV-ERB α /ROR Response element*

Dans le promoteur d'un gène, à la fois de la boucle négative et de la boucle positive, respectivement *Cry1* et *Bmal1*, il a été montré la présence de séquences ROREs. Cette séquence, 5'-(A/T)A(A/T)NT(A/G)GGTCA-3', avec N pour l'une des bases (Harding & Lazar, 1993 ; Forman *et al.*, 1994), est présente en triple et en double exemplaire dans les promoteurs de *Cry1* et *Bmal1*, respectivement (Etchegaray *et al.*, 2003 ; Preitner *et al.*, 2002 ; Ueda *et al.*, 2002). Ces séquences ROREs sont reconnues par des protéines appartenant à la

famille des récepteurs nucléaires orphelins, RORs ("Retinoic acid-related orphan receptor") et REV-ERBs (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Il existe différents types de protéines pour chacune de ces familles mais seul le rôle des sous-types " α " est en partie élucidé. Les protéines ROR α et REV-ERB α peuvent se fixer au niveau du promoteur de *Bmal1* ce qui a pour conséquence d'activer ou d'inhiber sa transcription, respectivement (Ueda *et al.*, 2002 ; Sato *et al.*, 2004 ; Akashi & Takumi, 2005). Dans le cas des souris *straggerer*, présentant une protéine ROR α tronquée et sans domaine de fixation à l'ADN, ce qui est dû à une mutation naturelle du gène *Rora*, l'expression de *Bmal1* et de *Cry1* dans les SCN ainsi que la période d'activité locomotrice des animaux sont réduites (Sato *et al.*, 2004 ; Akashi & Takumi, 2005). Les mutants *Rev-erba*, codant une protéine REV-ERB α sans domaine de fixation à l'ADN, présentent à l'inverse une augmentation des niveaux moyens d'ARNm de *Bmal1* et de *Cry1* mais cette mutation est quasiment sans conséquence sur l'activité locomotrice (Preitner *et al.*, 2002 ; Yin & Lazar, 2005). De plus, même si le promoteur de *Bmal1* possède deux ROREs, la mutation d'un seul élément inhibe très fortement l'action de ROR α comme celle de REV-ERB α (Ueda *et al.*, 2002 ; Yin & Lazar, 2005). Bien que la fixation de REV-ERB α (ou de ROR α) s'effectue par monomère sur chacun des sites, il est donc possible que l'interaction entre eux soit nécessaire au contrôle de l'activité transcriptionnelle. Par immunoprécipitation de la chromatine *in vitro*, il a été montré qu'en présence de REV-ERB α , les histones H3 et H4 sont déacétylées et le complexe N-CoR/HDAC3 ("Nuclear-receptor co-repressor/HDAC3") est également présent au niveau du promoteur de *Bmal1* (Yin & Lazar, 2005). Ainsi, REV-ERB α pourrait activer la HDAC3, ce qui provoquerait une déacétylation des histones H3 et H4 et donc une inhibition de la transcription de *Bmal1*. Dans les SCN, le pic de présence des ARNm de *Rev-erba* s'effectue en début de jour (Preitner *et al.*, 2002) et celui de *Rora* en milieu de jour (Ueda *et al.*, 2002). La transcription de *Bmal1* serait donc activement inhibée pendant le jour (par REV-ERB α) puis stimulée en début de nuit (par ROR α).

◆ *DBP-binding site & E4BP4-binding site*

L'étude du promoteur de *Per1* a permis de mettre en évidence, en plus des E-box, la présence de deux domaines de séquences très proches de la séquence DBP-binding site (Yamaguchi *et al.*, 2000a). La séquence optimale pour la fixation de DBP est 5'-(A/G)TTATGTAA(T/C)-3' et dans le promoteur de *Per1*, seule la base soulignée est remplacée par une cytosine. Cette séquence est située en amont de l'exon 1_A et de l'exon 1_B (Yamaguchi *et al.*, 2000a, b). Des constructions de parties du promoteur de *Per1* (comprises entre les exons 1_A et 1_B) couplées

avec un rapporteur luciférase, ont permis de rendre compte de l'effet transcriptionnel du DBP sur *Per1*. **Le DBP permet une augmentation des taux de transcrits de *Per1* indépendamment de l'effet de CLOCK/BMAL1** (Yamaguchi *et al.*, 2000b). Le DBP se fixerait à l'ADN via son domaine PAR ("Proline and acidic amino acid rich") (Lamprecht & Mueller, 1999). La propre transcription de *Dbp* est circadienne (présence de 3E-box) dans plusieurs tissus et présente dans les SCN un pic d'ARNm à ZT4 avec un pic de protéine en phase (ZT5-6 ; Yan *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2000b ; Ueda *et al.*, 2002 mais voir également Lopez-Molina *et al.*, 1997). Le pic de DBP est en phase avec le pic d'ARNm de *Per1*, confirmant alors son implication possible dans le contrôle de l'activité du promoteur de *Per1*. Le DBP fait partie de la famille des facteurs de transcription dits "à fermeture à leucine", qui agissent soit en s'homodimérisant soit en s'hétérodimérisant. Ainsi, deux autres membres de cette famille, le HLF ("Hepatic leukemia factor") et le TEF ("Thyrotroph embrionyc factor") connus pour participer *in vitro* au contrôle de la transcription de *Per1*, pourraient également jouer un rôle *in vivo* (Mitsui *et al.*, 2001).

La séquence "DBP-binding site" du promoteur de *Per1* est également proche de la séquence reconnue par un autre facteur de transcription à fermeture à leucine, mais dépourvu de domaine PAR, il s'agit de E4BP4 (désigné ainsi car cette protéine, synthétisée par le phage P4, a été premièrement isolée par liaison (binding) au promoteur E4 d'un adénovirus, Cowell *et al.*, 1992). *In vitro*, **E4BP4 s'homodimérise et inactive la transcription de *Per1* en entrant en compétition avec DBP**. L'étude du promoteur de *Per2* montre également la présence d'une séquence proche de la E4BP4-binding site (8 bases en commun sur 10) et la présence d'**E4BP4 permet une diminution de la transcription de *Per2* ainsi qu'un raccourcissement de la période des oscillations** (Akashi *et al.*, 2006). Dans les SCN, l'expression de *E4bp4* est circadienne et en quasi-opposition de phase avec *Dbp* (pic d'ARNm de *E4bp4* à ZT12-16, Mitsui *et al.*, 2001) et sa transcription semble être sous le contrôle de l'horloge via sa séquence RORE (Ueda *et al.*, 2002). Chez les souris mutantes *Cry1^{-/-}2^{-/-}*, *Dbp* est sur-exprimé, et à l'inverse, *E4bp4* est toujours inhibé, montrant ainsi que le contrôle de *E4bp4* se fait de manière opposée à *Dbp*. Ainsi, CLOCK/BMAL1 permettrait l'activation directe de *Dbp* et indirectement l'inactivation d'*E4bp4* qui à leur tour, vont, respectivement, stimuler (pic d'activation en milieu de jour) ou inhiber (pic d'inhibition en milieu de nuit) la transcription des gènes munis de DBP/E4BP4-binding site tels que *Per1* et *Per2*.

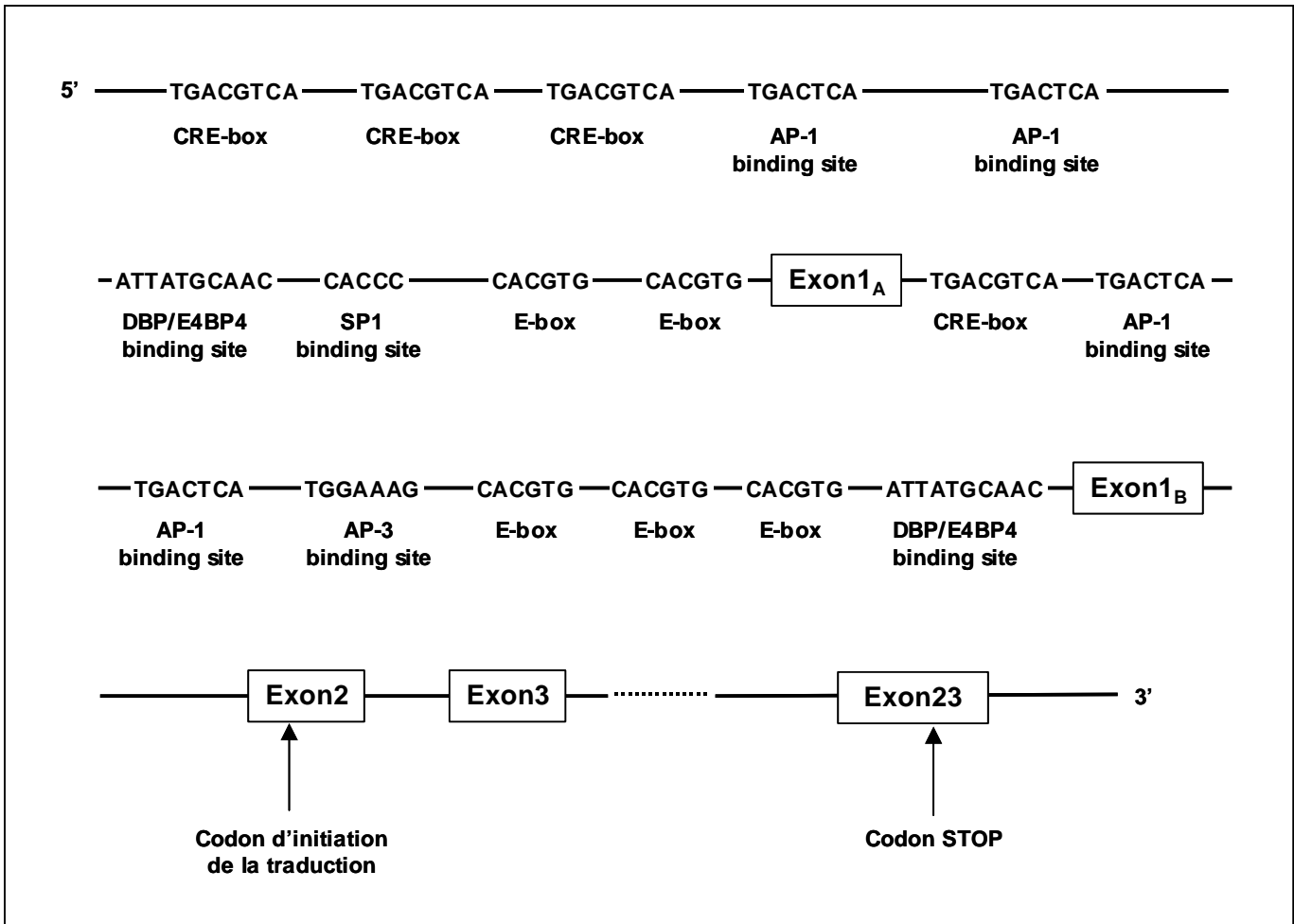


Figure 15 : Schématisation du promoteur murin de *Per1*.

Etendue 5' vers 3' du promoteur de *mPer1*. L'ordre des différents motifs respecte les données de la littérature mais les distances les séparant sont arbitraires. Les sites des codons d'initiation et d'arrêt de la traduction sont également localisés. La partie précédant le codon d'initiation de la traduction (ATG) forme l'UTR5' et celle succédant au codon STOP (TGA dans ce cas) forme l'UTR3'. Les domaines PAS, non représentés ici, sont codés par les exons 6 pour PAS-A et 9-10 pour PAS-B. Modifié d'après Weiher *et al.*, 1983 pour la séquence AP-3 et d'après Hida *et al.*, 2000 et Yamaguchi *et al.*, 2000a, pour les autres séquences.

AP-1/3, Activator protein 1/3; CRE, cAMP Response element; DBP, Albumin gene D-site binding protein; SP1, Specificity protein 1.

◆ Conclusion

La régulation transcriptionnelle des gènes horloges des boucles négatives fait essentiellement intervenir la présence des E-box mais nous avons vu que d'autres domaines, présents dans certains promoteurs horloges et absents dans d'autres permettent également de réguler l'activité transcriptionnelle. Une schématisation du promoteur complet de *Per1* est donnée [figure 15](#). Ce promoteur présente plusieurs E-box, CRE-box et DBP/E4BP4-binding site, mais est dépourvu de ROREs. De plus, des domaines autres que ceux décrits ci-dessus existent dans les promoteurs des différents gènes horloges et pourraient également avoir un rôle dans la génération de l'expression rythmique des gènes horloges. Par exemple, dans le cas de *Per1*, se situe, en plus des E-box et des motifs décrits précédemment, une séquence AP-3 dont l'activité n'a pas encore été élucidée. Certains motifs du promoteur de *Per1*, comme les motifs AP-1 ("Activator protein 1") et SP1 ("Specificity protein 1") sont peu étudiés dans la régulation de l'activité du promoteur *Per1*, leur rôle n'a pas été encore évoqué dans ce manuscrit. Nous verrons qu'il est possible qu'ils interviennent dans la voie de signalisation déclenchée par le glutamate pour AP-1 (au [chapitre A.1.4.3.](#)) et par le glucose pour SP1 (au [chapitre A.1.5.1.](#)). Un autre motif encore, (A/T)DR2, n'est pas présent dans le promoteur de *Per1* et son rôle sera évoqué dans le cas précis de la régulation de la transcription de *Bmall* et de *Rev-erba* au [chapitre A.1.5.3.](#)

1.3.2.2. Régulation Post-transcriptionnelle.

Les niveaux stables (détectables) d'ARNm dépendent de facteurs combinés et regroupés par le contrôle transcriptionnel (taux de synthèse, voir précédemment) et le contrôle post-transcriptionnel (épissage, transport de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, localisation cellulaire, stabilité). Chez les Eucaryotes, la dégradation des ARNm est un déterminant essentiel de la régulation de l'expression génique et peut-être modulée par des signaux métaboliques, environnementaux ou encore au cours du développement. Ce niveau de **régulation post-transcriptionnelle** est particulièrement important pour les protéines actives sur de courtes périodes, comme les facteurs de transcription, les facteurs de croissance et les protéines contrôlant la progression du cycle cellulaire (Beelman & Parker, 1995; Tourrière *et al.*, 2002 ; Audic & Hartley, 2004). Cette régulation mise en évidence dans de nombreux systèmes, a été peu étudiée dans le domaine de l'horloge circadienne. Nous ne rapporterons ici que les données obtenues dans l'étude de la régulation des ARNm des gènes horloges. La

demi-vie des ARNm dépend de plusieurs facteurs : des séquences spécifiques de l'ARNm au niveau de la séquence codante et des UTR 5' et UTR 3'.

- *Régulation par la coiffe* : seulement deux protéines à activité exonucléase 5' interviennent pour la dégradation de cette coiffe, DCP1P et DCP2P, la seconde permettant l'activation de la première qui est la forme active de la dégradation de la coiffe. Ces deux protéines doivent se fixer sur l'ARNm mais ceci ne peut se faire que lorsque la protéine PABP1 ("poly(A) binding protein 1") est décrochée de l'ARNm (Tharun & Parker, 2001). De plus, leur efficacité dépend de différents facteurs et notamment de la longueur de la queue poly(A).

- *Régulation par la queue poly(A)* : la queue poly(A) est stabilisée et protégée dans le cytoplasme par fixation de la PABP1. Sa présence et sa taille contribuent à la dégradation des ARNm chez les Procaryotes et au maintien de ceux-ci chez les Eucaryotes (Dreyfus & Régnier, 2002). De nombreuses protéines peuvent dégrader l'ARNm en reconnaissant des motifs spécifiques : c'est le cas des endonucléases. Cependant, l'activité exonucléase 3' ou **désadénylation** apparaît comme étant **l'étape limitante et initiale** de la dégradation de nombreux ARNm (Couttet *et al.*, 1997). La durée de vie d'un ARNm dépend donc d'un équilibre entre la longueur de la queue poly(A) et de la vitesse de désadénylation. Les désadénylases sont peu connues et encore très peu étudiées... La seule démonstration *in vivo* d'une régulation par la longueur de la queue poly(A) dans les SCN, concerne le gène *Avp*. La longueur de son ARNm varie entre une forme à 740 nucléotides de jour, à une forme désadénylée de 530 nucléotides de nuit (Robinson *et al.*, 1988) ce qui peut être mis en parallèle avec les variations circadiennes de l'AVP dans le fluide cérébrospinal sous le contrôle des SCN (Schwartz & Reppert, 1985 ; Gillette & Reppert, 1987).

◆ *Poly(A) RiboNucléase*

En 1997, l'équipe de Korner & Wahle isola pour la première fois chez le veau, une protéine présentant une telle activité : la protéine Poly(A) RiboNucléase (PARN). Elle sera ensuite mise en évidence chez le xénope (Copeland & Wormington, 2001) puis chez *Arabinopsis thaliana* (Chiba *et al.*, 2004). La séquence codante de cette protéine est hautement conservée chez toutes les espèces étudiées, exceptée les levures où elle est absente. Elle présente un domaine de reconnaissance de l'ARNm, spécifique aux membres de la famille des Rnases de type D (Copeland & Wormington, 2001). De plus, les démonstrations de son **activité exonucléase 3'** existent *in vitro* (Copeland & Wormington, 2001; Chiba *et al.*, 2004) mais aussi *in vivo*, dans les œufs de xénope (Baggs & Green, 2003). L'étude d'une telle protéine

montre qu'elle a une part importante dans la régulation de l'activité cellulaire. Cette protéine pourrait-elle jouer un rôle actif dans le maintien des oscillations des gènes horloges ? Apparemment non, dans la mesure où elle apparaît comme étant principalement nécessaire au cours du développement, même si elle est présente à l'état adulte. De plus, elle est exprimée de façon non rythmique dans le centre initiateur des rythmes circadiens chez le xénope (Baggs & Green, 2003) mais, son activité pourrait être circadienne.

◆ *Nocturnin*

Une seconde protéine encore moins connue, la NOCTURNIN, a été découverte par l'équipe de CB. Green (Green & Besharse, 1996). La présence de ses ARNm montre des oscillations circadiennes dans la rétine de xénope mais elle est limitée aux cellules photoréceptrices (constituant l'horloge principale chez cette espèce) ce qui suppose un rôle dans les rythmes circadiens. La présence rythmique des ARNm de *Nocturnin* a été par la suite mise en évidence chez la souris, dans l'hypothalamus, le foie et d'autres organes périphériques (Wang *et al.*, 2001). L'étude de son promoteur chez le xénope fait apparaître une E-Box... mais celle-ci semble fonctionner comme une boîte CRE au niveau des cellules de la rétine (Liu & Green, 2001, 2002). A l'inverse, Oishi et coll. (2003) rapportent que chez la souris, l'expression de *Nocturnin* dans le foie est rythmique chez les souches sauvages et chez les souris *Clock^{mut}* mais avec une plus faible amplitude et enfin, stable et toujours élevée chez les souris *Cry1^{-/-}* *Cry2^{-/-}*. Ceci permet de penser que dans le foie de la souris, le gène *Nocturnin* est sous régulation partielle du dimère CLOCK/BMAL1. *In vitro*, son action dépendante du magnésium, consiste à dégrader spécifiquement les ARN messagers par la queue poly(A) sans distinction apparente pour les régions situées en amont de celle-ci (Baggs & Green, 2003). Par contre, il n'a jamais été montré si la NOCTURNIN peut dégrader les ARNm d'un gène horloge. Il se pourrait même qu'elle agisse sur sa propre production.

1.3.2.3. Régulation Traductionnelle.

Ce niveau de régulation n'a été que très peu élucidé (étudié) chez les mammifères. Chez la drosophile, il reste également le niveau le moins renseigné. Des protéines fixant l'ARN ou RBP ("RNA-binding protein"), contenant donc des motifs de reconnaissance de l'ARN, peuvent être impliquées dans la régulation de la traduction des ARN (Burd & Dreyfuss, 1994; Siomi & Dreyfuss, 1997). Or, de telles protéines présentent des variations circadiennes dans le cytoplasme des neurones chez la drosophile et chez la souris (Claridge-Chang *et al.*, 2001;

Panda *et al.*, 2002a). Le gène *dLark* codant une de ces protéines, est contrôlé par l'horloge chez la drosophile (Zhang *et al.*, 2000). Bien que ses cibles n'aient pas encore été identifiées, il est possible qu'il intervienne dans le contrôle de la régulation des gènes horloges. Chez les mammifères, il a été montré que l'UTR 3' des ARNm de *Per1* permet de contrôler l'efficacité de leur traduction (Kojima *et al.*, 2003) mais l'action directe d'une RBP reste à démontrer. Des données récentes suggèrent que chez la souris, les équivalents du gène *dLark* de la drosophile interviennent dans la régulation de la traduction des ARNm de *Per1* (Kojima *et al.*, 2006).

1.3.2.4. Régulation Post-traductionnelle.

La présence d'une mutation naturelle, baptisée *tau*, affectant la période circadienne de l'activité locomotrice a été mise en évidence pour la première fois en 1988 chez le hamster syrien (Ralph & Menaker, 1988). La période du rythme d'activité locomotrice en conditions constantes d'éclairage est d'environ 24h chez les animaux sauvages, de 22h chez les mutants hétérozygotes et de 20h chez les homozygotes. A l'époque l'origine de ce phénotype n'était pas encore connue, et il aura fallu attendre plusieurs années pour coupler ce phénotype particulier à un dysfonctionnement du contrôle post-traductionnel des protéines horloges. Depuis, de nombreuses voies de contrôle faisant intervenir plusieurs protéines, notamment des protéines kinases, ont été évoquées dans le contrôle des protéines horloges. Comme les protéines horloges présentent des variations circadiennes de phosphorylation (Lee *et al.*, 2001), l'étude du rôle de ces phosphorylations est devenu très important ces dernières années. En plus des phosphorylations par diverses protéines, nous verrons que les protéines horloges peuvent subir d'autres changements. Ces changements auront pour effets de contrôler la stabilité, l'activité et la localisation de protéines horloges avec un effet pouvant être spécifique de la protéine horloge concernée.

◆ Caséine kinase I_ε

La famille des Caséine kinase I présente 7 isoformes et appartient au groupe des protéines kinases à motif Sérine/Thréonine (Flotow *et al.*, 1991 ; Gross & Anderson, 1998). De ces isoformes, seules les CKI_ε et CKI_δ ("Caséine kinase I_{ε/δ}") semblent jouer un rôle dans le contrôle circadien des protéines horloges (Vielhaber *et al.*, 2000 ; Camacho *et al.*, 2001).

La CKI_ε tout comme ses messagers, est exprimée dans les SCN, de façon constitutive (Lowrey *et al.*, 2000 ; Takano *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2001 ; Ishida *et al.*, 2001). Elle présente

néanmoins un rythme d'activité en fonction de son état de phosphorylation. Son auto-phosphorylation multiple (8 sites) provoque son inhibition et sa déphosphorylation par diverses phosphatases, dont la calcineurine ou PP2B ("protein phosphatase 2B"), l'active (Graves & Roach, 1995 ; Cegielska *et al.*, 1998 ; Gietzen & Virshup, 1999 ; Liu *et al.*, 2002 ; Swiatek *et al.*, 2004). Son interaction avec les protéines horloges a été démontrée dans différentes situations de cultures cellulaires et *in vivo*. Quel que soit le système étudié, il semble clair que la CKI_ε peut se fixer directement sur PER1 et PER2 (cellules embryonnaires de foie humain HEK293 : Vielhaber *et al.*, 2000 ; Camacho *et al.*, 2001 ; Eide *et al.*, 2002 ; cellules 293T : Takano *et al.*, 2000 ; réticulocyte de lapin : Toh *et al.*, 2001 ; cellules COS7 : Akashi *et al.*, 2002 ; cellules de poumon humain WI-38 : Miyazaki *et al.*, 2004). Dans le cas de PER3, certains auteurs trouvent également cette fixation (Akashi *et al.*, 2002) mais d'autres ne rapportent qu'une interaction indirecte par l'intermédiaire de PER1 (Lee *et al.*, 2004). Le domaine d'interaction directe entre la CKI_ε et PER1 ou PER2, se situe entre le domaine PAS-B et le domaine de fixation des CRYs ([figure 16A](#)). En revanche, il ne semble pas y avoir d'interaction directe entre la CKI_ε et les protéines CRYs qui nécessiteraient la formation du dimère PER/CKI_ε, pour former alors un trimère CRY/PER/CKI_ε, pour être phosphorylées (Akashi *et al.*, 2002 ; Eide *et al.*, 2002). Dans tous les cas, il en résulte une ou plusieurs phosphorylations des protéines horloges (Hirayama & Sassone-Corsi, 2005). Les effets supposés de ces phosphorylations sont représentés [figure 16B](#). **La première conséquence de la phosphorylation par la CKI_ε des protéines horloges de la boucle négative est le contrôle de leur localisation cellulaire, mais cela reste très controversé.** Par exemple, pour PER1, la phosphorylation par la CKI_ε soit n'aurait aucun effet sur la localisation cellulaire de PER1 (Lee *et al.*, 2001) soit empêcherait son entrée dans le noyau en masquant son "signal de localisation nucléaire" (Vielhaber *et al.*, 2000 ; Eide *et al.*, 2002 ; Miyazaki *et al.*, 2004) ou encore de faciliterait son entrée (Takano *et al.*, 2000). Les résultats parfois divergents concernant la régulation de la localisation cellulaire des autres protéines sont présentés [figure 16C](#). **La dégradation des protéines de la boucle négative est la seconde conséquence de la phosphorylation par la CKI_ε.** Cette dégradation ferait intervenir le complexe du protéasome et elle est retrouvée dans toutes les études (par exemples, surexpression ou inhibition de la CKI_ε, Keesler *et al.*, 2000 et Miyazaki *et al.*, 2004, respectivement). Dans le cas de la boucle positive, la CKI_ε aurait pour conséquence d'augmenter l'activation de BMAL1 (Eide *et al.*, 2002 mais voir aussi Sato *et al.*, 2006) et son action sur CLOCK reste encore incertaine (Lee *et al.*, 2001 vs Eide *et al.*, 2002).

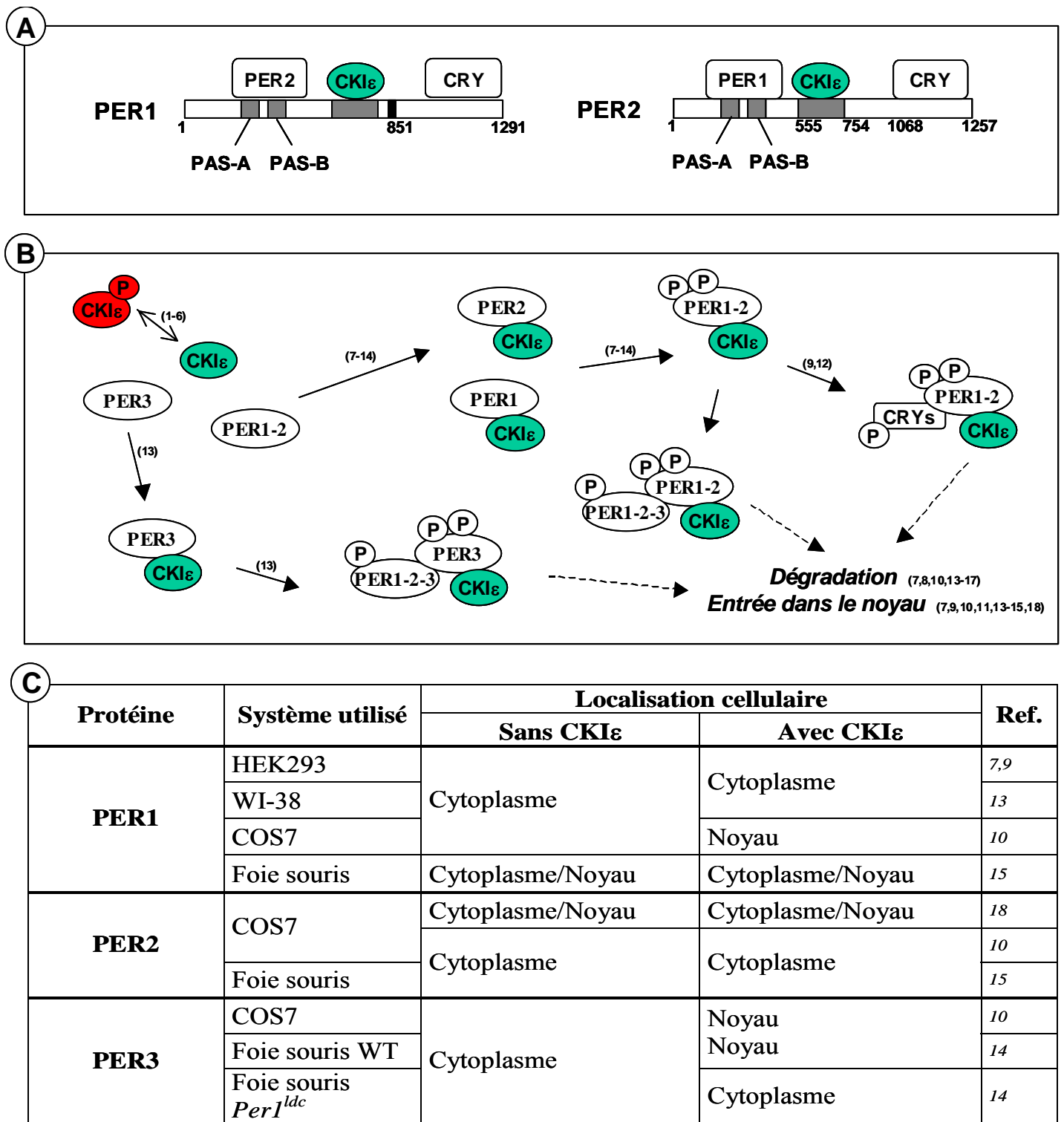


Figure 16: Contrôle post-traductionnel des PERs par la Caséine Kinase Iε (CKIε).

A. Représentation des séquences de mPER1 et 2 chez la souris avec sites de fixation. **B.** Mécanismes d'action et effets supposés de la CKIε. **C.** Régulation de la localisation cellulaire des protéines PERs par la CKIε.

(1) Lowrey *et al.*, 2000; (2) Graves and Roach, 1995; (3) Cegielska *et al.*, 1998; (4) Gietzen and Virshup, 1999; (5) Liu *et al.*, 2002; (6) Swiatek *et al.*, 2004; (7) Vielhaber *et al.*, 2000; (8) Camacho *et al.*, 2001; (9) Eide *et al.*, 2002; (10) Takano *et al.*, 2000; (11) Toh *et al.*, 2001; (12) Akashi *et al.*, 2002; (13) Miyasaki *et al.*, 2004; (14) Lee *et al.*, 2004; (15) Lee *et al.*, 2001; (16) Keesler *et al.*, 2000; (17) Eide *et al.*, 2005; (18) Yagita *et al.*, 2002.

Nous avons vu précédemment que la mutation *tau* chez le hamster syrien provoque une période d'activité endogène plus courte que celle des individus sauvages. Cette mutation concerne l'activité de la protéine CKI_ε. L'expression du gène ne semble pas affectée mais l'efficacité de transfert de phosphate de la protéine est considérablement réduite (Lowrey *et al.*, 2000). Il en résulte une accumulation plus rapide des protéines de la boucle négative donc l'inhibition de leur propre transcription intervient également plus tôt. Les boucles "tournent" plus vite ce qui provoque cette diminution de période endogène. La CKI_ε joue également un rôle important dans le cas des syndromes d'avance de phase ou de retard de phase du sommeil (Eide *et al.*, 2001 ; Toh *et al.*, 2001 ; Ebisawa *et al.*, 2001).

◆ *Caséine kinase I δ*

Tout comme son homologue, la CKI_δ ne présente pas de rythme de ses messagers mais un rythme d'activité rendue possible par son autoinhibition par phosphorylation et par son activation par déphosphorylation (Graves & Roach, 1995 ; Cegielska *et al.*, 1998 ; Ishida *et al.*, 2001). Sa présence a été démontrée *in vivo* au sein des SCN et en culture, elle peut fixer PER1 et PER2, les phosphoryler ce qui a comme conséquence d'induire leur dégradation (Camacho *et al.*, 2001). Les rôles respectifs de ces deux isoformes de la caséine kinase I ne sont pas encore élucidés et de futures expériences devront permettre de les caractériser.

◆ *Mitogen-activated protein kinase*

La régulation des boucles moléculaires par la voie des MAPK ("Mitogen-activated protein kinase") s'effectue à la fois au niveau transcriptionnel via l'activation de la phosphorylation de CREB ([chapitre suivant](#)) mais aussi, au niveau des protéines horloges. En 1998, Yang et coll. mettaient en évidence une interaction entre BMAL1 et MAPK. Cette interaction permettrait à la fois la translocation vers le noyau mais aussi des modifications de la structure tridimensionnelle de BMAL1. La dimérisation préférentielle de BMAL1 avec P-MAPK (la forme active des MAPK) plutôt qu'avec MAPK, aurait pour conséquence une diminution de la transactivation de BMAL1 sur les E-box (Sanada *et al.*, 2002). Cependant, BMAL1 est phosphorylée *in vitro* en Ser527, Ser599 et Thr534 par la P-MAPK et seul ce dernier site permet une inhibition de la transactivation. Sanada et coll. (2002) rapportent également qu'aucune interaction n'est réalisée entre MAPK et CLOCK, le second acteur de la boucle positive. On sait que l'activation transcriptionnelle due au complexe CLOCK/BMAL1 est fortement diminuée en fin de jour et pendant la nuit et nous avons également vu précédemment que BMAL1 est exprimée soit de façon rythmique (pic de CT0 à CT8) soit de

façon constitutive ([paragraphe A.1.3.1.1.](#), Maywood *et al.*, 2003 ; von Gall *et al.*, 2003). Si BMAL1 présente des niveaux stables, une inactivation de BMAL1 en fin de jour par les P-MAPK pourrait expliquer, au moins en partie, cette diminution de transactivation. Or, bien que les MAPK ne soient pas exprimées de façon rythmique, un pic d'activation avec des valeurs maximales comprises entre CT6 et CT10 et des valeurs minimales entre CT18 et CT24, est observé dans les SCN, à l'exclusion de leur région centrale (Obrietan *et al.*, 1998 ; Pizzio *et al.*, 2003). Il est donc possible que les P-MAPK contrôlent temporellement l'activité de BMAL1, au moins en fin de jour/début de nuit.

Des données plus récentes montrent que la voie des MAPK intervient non seulement dans la boucle positive mais aussi dans la boucle négative. En effet, la P-MAPK phosphoryle CRY1 en Ser247 et CRY2 en Ser265 à la fois *in vitro* et *in vivo*, et CRY2 en Ser557 mais *in vitro* seulement (Sanada *et al.*, 2004). La conséquence de cette phosphorylation est une diminution de la capacité des CRYs à inhiber CLOCK/BMAL1. Or, comme dans la région centrale des SCN, le pic de P-MAPK se situe entre CT14 et CT20 (Obrietan *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2003 ; Nakaya *et al.*, 2003) et celui de CRY1 et CRY2 entre CT12 et CT16 (Kume *et al.*, 1999), l'action des P-MAPK serait de permettre de lever l'inhibition due à CRY1 et CRY2 en milieu de nuit. Mais comme P-MAPK diminue en fin de nuit, il en résulte une ré-activation de la transcription due à CLOCK/BMAL1 en fin de nuit. Ainsi, on peut penser que les P-MAPK interviendraient dans la région centrale des SCN pour réguler l'activité transcriptionnelle de CLOCK/BMAL1 soit directement (via BMAL1) soit indirectement (via CRYs).

◆ *Proteine kinase G de type II*

L'activité de la PK_G ("Protéine kinase dépendante du cGMP") est régulée par l'horloge et présente un maximum d'activité en fin de nuit subjective (Tischkau *et al.*, 2003b). Cette protéine existe sous plusieurs isoformes : PK_GI- α , PK_GI- β et PK_GII. Seule cette dernière isoforme semble intervenir dans le contrôle des gènes horloges. En effet, seule l'application d' α ODN (" α Oligodéoxynucléotides") spécifique de la PK_GII sur des tranches de SCN provoque une variation de l'activité électrique spontanée des neurones des SCN (Tischkau *et al.*, 2004). La PK_GII peut interagir directement avec CLOCK permettant ainsi d'augmenter son degré de phosphorylation. Elle peut également agir sur le second acteur de la boucle moléculaire positive, *Bmal1*, en permettant indirectement une diminution de ses niveaux d'ARNm (Tischkau *et al.*, 2004). Bien que le rôle de cette phosphorylation de CLOCK par la PK_GII ne soit pas encore élucidé, son intervention dans le contrôle de la transcription dirigée par le dimère CLOCK/BMAL1, est plausible.

◆ *Glycogen synthase kinase-3 α*

La présence de la GSK3 ("Glycogen synthase kinase-3") dans les SCN et sous deux isoformes, a été révélée dès 1990, par Woodgett. Cependant, il a fallu attendre une dizaine d'années pour que le rôle de la GSK dans le domaine des rythmes soit démontré. D'ailleurs, Cohen et coll. titrent en 2001: "The renaissance of GSK3". La GSK est une kinase à motif sérine/thréonine d'abord décrite comme étant impliquée dans le contrôle du métabolisme du glycogène, mais elle intervient dans de nombreux autres processus (Frame & Cohen, 2001). De plus, les rôles circadiens joués par les deux isoformes, semblent être différents.

La présence de la GSK-3 α présente une oscillation circadienne avec un pic obtenu à CT5 chez la souris (Iwahana *et al.*, 2004). Elle est inactivée par phosphorylation en Ser21 par la RSK-1 et activée par l'action de la PP2A ("Protéine phosphatase 2A", Sutherland & Cohen, 1994). Son effet moléculaire au sein de l'horloge n'a pas encore été identifié mais il semble qu'elle soit impliquée dans le contrôle de la période circadienne. En effet, l'application de lithium sur des cultures de neurones individuels de SCN provoque une augmentation de leur période de décharges (Abe *et al.*, 2000). Du lithium ajouté à la nourriture des souris, provoque également une augmentation de la période circadienne de l'activité locomotrice. Mais au sein des SCN, ce traitement provoque à la fois une diminution de la GSK-3 α et une augmentation de la P-GSK-3 α , résultant en une diminution de l'activité de cette protéine (Iwahana *et al.*, 2004). Cet effet étant spécifique aux SCN, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'inactivation de la GSK-3 α traduit l'effet du lithium sur les SCN et donc sur l'organisme entier. Ainsi, la GSK-3 α aurait un rôle actif dans la régulation de la période des rythmes endogènes.

◆ *Glycogen synthase kinase-3 β*

L'apparition de la GSK-3 β dans le domaine de l'étude des rythmes circadiens, étant très récente, il n'y a que très peu de travaux portant sur le rôle joué par cette protéine kinase, mais, ils apportent des données nouvelles dans la régulation post-traductionnelle de CRY2.

Précédemment, nous avons vu que CRY2 pouvait être phosphorylée par les MAPK en Ser265 mais pas au niveau de Ser557 *in vivo* (Sanada *et al.*, 2002). La protéine GSK-3 β présente la particularité de reconnaître une séquence formée d'un résidu Ser (l'accepteur de phosphate) et d'un second résidu Ser éloigné de 4 résidus (côté carboxy-terminal) lui-même déjà phosphorylé, soit -SxxxS(P), x étant un acide aminé quelconque (Fiol *et al.*, 1987). Harada et coll. (2005) montrent la présence d'un tel motif en comparant les séquences protéiques de

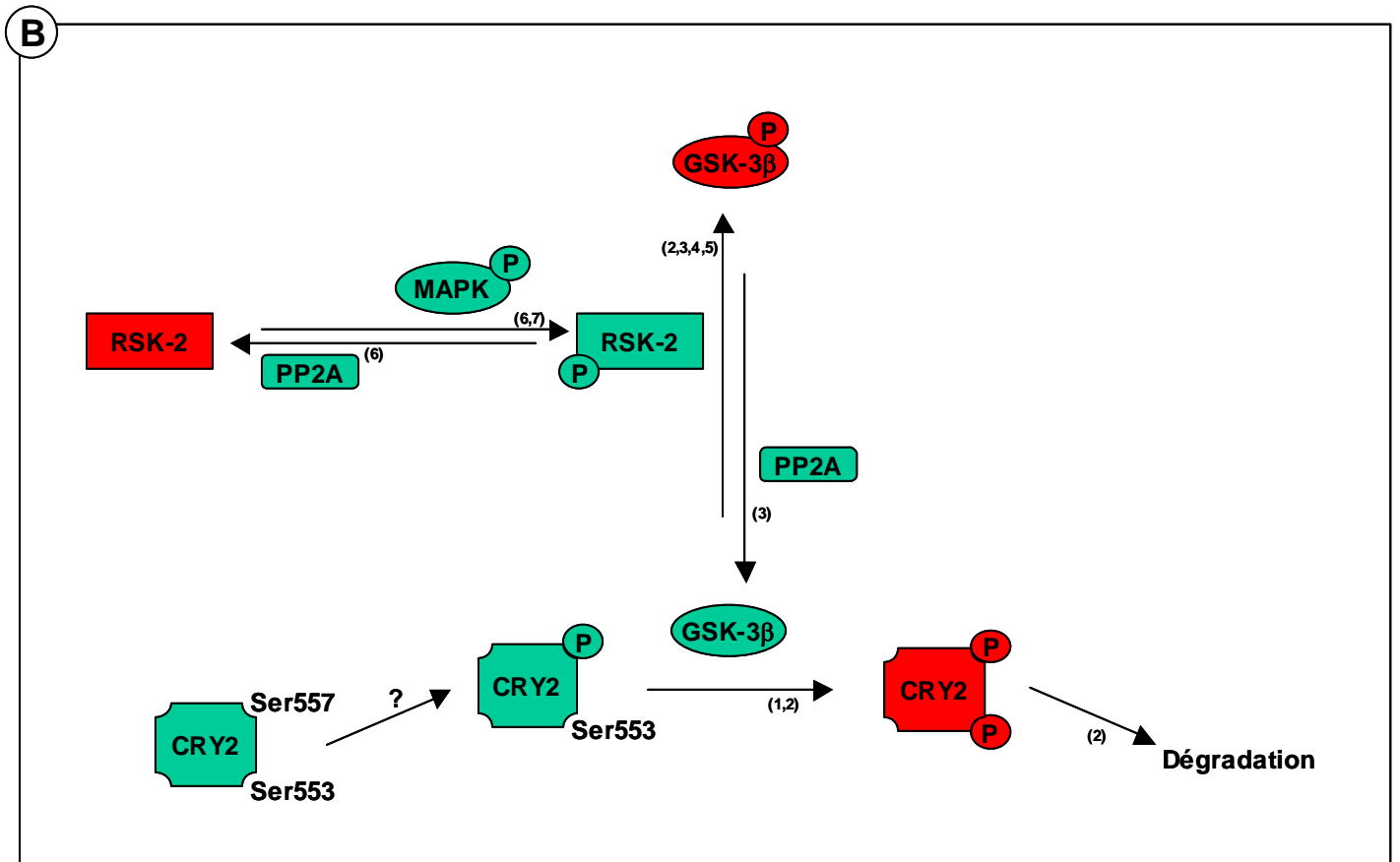
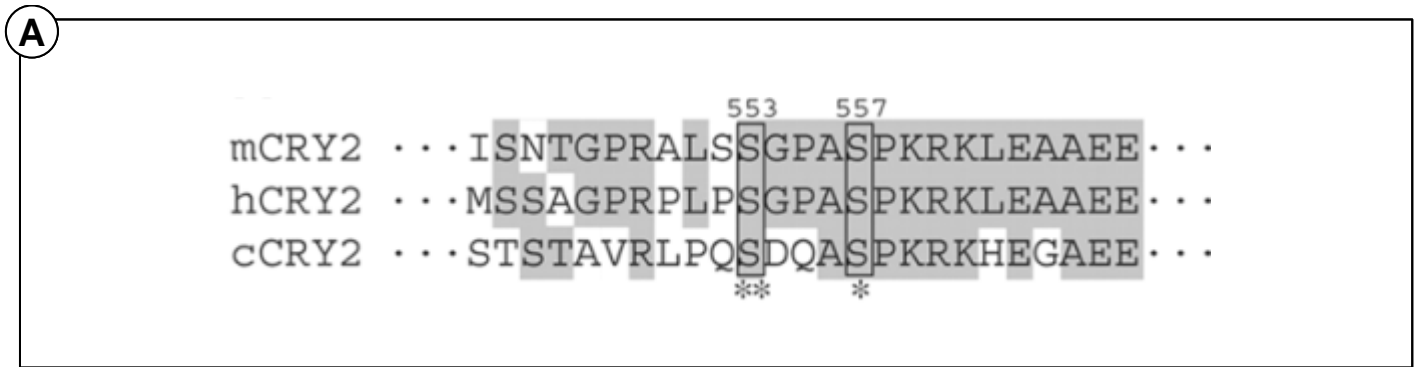


Figure 17 : Contrôle post-traductionnel par la Glycogène Synthase Kinase 3 β (GSK3 β).

A. Représentation d'une partie de la séquence de CRY2 chez la souris (m), l'homme (h) et le poulet (c) avec en encadré, le motif de reconnaissance de la GSK3 β et en foncé, les homologies de séquences. **B.** Représentation schématique du mode d'action et du contrôle de la GSK3. La couleur rouge présente l'état d'inactivation et la couleur verte celui d'activation de protéines.

(1) Fiol *et al.*, 1987; (2) Harada *et al.*, 2005; (3) Sutherland *et al.*, 1993; (4) Sutherland *et al.*, 1994; (5) Eldar-Finkelman *et al.*, 1995; (6) Sturgill *et al.*, 1988; (7) Butcher *et al.*, 2004.

CRY2 de la souris, de l'homme et du poulet ([figure 17A](#)). A l'aide d'études *in vitro* menées sur des cellules COS7, cette équipe a mis en évidence que la phosphorylation en Ser553 de CRY2 est bien effectuée par GSK-3 β du moment que CRY2 présente déjà une phosphorylation en Ser557 formant donc le motif –Ser553(P)xxxSer557(P). Il en résulte la formation de CRY2-(P)₂ qui serait très instable et rapidement dégradée par le complexe du protéasome. De plus, la GSK-3 β exprimée de façon constitutive, présente une régulation de son activité par des phosphorylations/déphosphorylations. En effet, elle est rendue inactive par phosphorylation en Ser9 (Sutherland *et al.*, 1993 et pour revue, Frame & Cohen, 2001). Cette phosphorylation est circadienne et présente un pic en fin de jour subjectif/début de nuit subjective, donc peu avant le pic de CRY2 (Harada *et al.*, 2005). Ce processus d'inactivation semble être catalysé par plusieurs kinases dont la RSK-2 (Sutherland *et al.*, 1993 ; Sutherland & Cohen, 1994 ; Eldar-Finkelman *et al.*, 1995). Or, comme l'activité des RSK, et par-là même de la RSK-2, est induite par phosphorylation par la voie des MAPK (Sturgill *et al.*, 1988 ; Butcher *et al.*, 2004), on peut supposer que l'activité de la GSK-3 β est sous le contrôle de la voie des MAPK. En accord avec cette hypothèse, le rythme d'activation des MAPK est en phase avec le maximum d'inhibition de la GSK-3 β (Harada *et al.*, 2005). L'ensemble de ces mécanismes supposés sont présentés [figure 17B](#). Cependant, la kinase permettant la phosphorylation de Ser557 n'a pas encore été identifiée mais il existe un rythme de CRY2-(P)_{Ser557} avec une accumulation située en fin de jour/début de nuit. Il faut noter qu'à chacun des niveaux de régulation que l'on vient de décrire, il existe un mécanisme inverse faisant intervenir la PP2A mais dont le mode de régulation dans le domaine des rythmes, n'est pas encore connu...

◆ *SUMOylation*

La SUMOylation ("Small ubiquitin-related modifier protein") sur des résidus lysine est une réaction enzymatique réversible (Gill, 2003, 2004) intervenant dans le contrôle de différents processus dont la régulation de la transcription, la structure de la chromatine et la localisation des protéines cibles (Desterro *et al.*, 1998 ; Matunis *et al.*, 1998 ; Gill, 2004). Le motif de sumoylation est constitué de la séquence Ψ KxE/D avec Ψ : un résidu hydrophobe, K : la lysine, x : un acide aminé quelconque, E : l'acide glutamique et D : l'acide aspartique (Gill, 2004). Or, BMAL1 présente de tels motifs entre ses domaines PAS-A et PAS-B ([figure 18](#)). Il a été montré que BMAL1 est sumoylée en Lys259 permettant ainsi ses variations rythmiques comme sa dégradation (Cardone *et al.*, 2005). Cette expérience effectuée dans le foie de souris, montre un pic de BMAL1-SUMO à ZT9. De plus, CLOCK permet

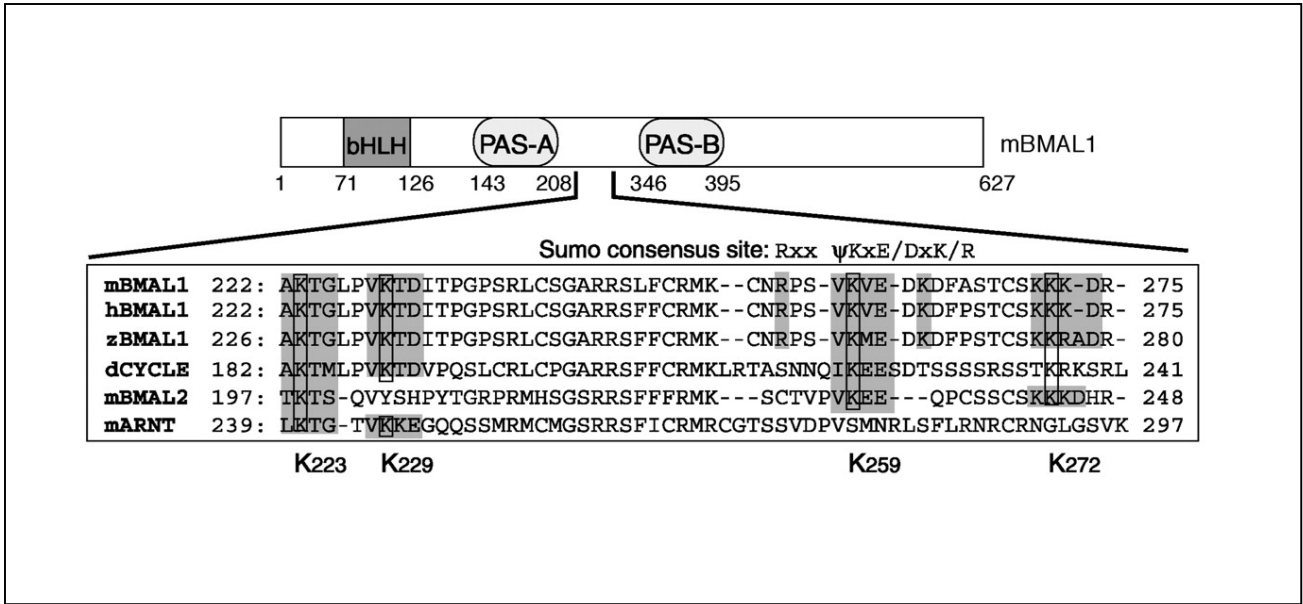


Figure 18 : Représentation des motifs SUMO dans la séquence de BMAL1 chez différentes espèces (d'après Cardone et al., 2005).

En haut est représentée mBMAL1 avec les domaines PAS-A, PAS-B et bHLH. **En bas**, la séquence des acides aminés de la zone comprise entre les deux domaines PAS. m, mouse ; h, human; z, zebra fish; d, drosophile.

d'augmenter les quantités de BMAL1-SUMO ce qui prouve l'importance de la sumoylation dans le contrôle de la rythmicité de la transcription de gènes sous contrôle CLOCK/BMAL1 comme *Dpb* (Cardone *et al.*, 2005). Un tel processus serait donc nécessaire au bon fonctionnement de la boucle positive.

◆ *Complexe du protéasome*

Sachant que la phosphorylation des protéines de la boucle négative provoque leur dégradation dans de nombreux cas, des études ont tenté de décrire les mécanismes sous-jacents. La dégradation de CRY2 est régulée au moins en partie par le protéasome sous l'action de la GSK-3 β car, *in vitro*, une augmentation de la concentration en ATP permet une dégradation plus rapide et inversement, l'ajout de MG132 (inhibiteur du protéasome 26S) empêche cette dégradation (Harada *et al.*, 2005). Dans le cas de PER2, sa phosphorylation par la CKI ϵ permet sa dimérisation avec une ubiquitine ligase de classe E3, la β -TrCP (" β -Transducin repeat containing protein"). Cette protéine a la particularité de ne fixer ses substrats que s'ils sont phosphorylés (Winston *et al.*, 1999). PER2 présente un motif β -TrCP-like (⁴⁷⁷SSGYGS⁴⁸² avec S pour la sérine, G pour la glycine et Y pour la tyrosine) dont l'acide aminé essentiel semble être phospho-Ser478 (Eide *et al.*, 2005). Il en résulterait ensuite une poly-ubiquitination de PER2 via le motif F-box de la β -TrCP (Margottin *et al.*, 1998 ; Hart *et al.*, 1999) conduisant à la dégradation de PER2 (Eide *et al.*, 2005). En revanche, la stabilité de PER2 est augmentée par sa dimérisation avec CRY1 et réciproquement (Yagita *et al.*, 2002), supposant donc un équilibre entre la formation du complexe CKI ϵ /PER2/CRY1 stabilisé et des complexes PER2/ β -TrCP et CKI ϵ /PER2/ β -TrCP instables. Mais, le mécanisme de stabilisation de PER2 par CRY1 (masquage du motif β -TrCP-like, changement de conformation de PER2...) n'est pas encore connu.

Parmi les acteurs de la voie de dégradation des protéines par le complexe du protéasome, une autre protéine pourrait intervenir, l'UCHL1 ("Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1"). Les souris porteuses de la mutation *gad* ("Gracile axonal dystrophy"), affectant le gène *Uchl1* (Saigoh *et al.*, 1999), présentent un dysfonctionnement de l'ubiquitination des protéines (Osaka *et al.*, 2003). Il est donc possible que l'UCHL1, dont l'expression est constitutive et élevée dans les SCN, intervienne dans cette dégradation (Zhang *et al.*, 2004 ; Dong *et al.*, 2005).

1.3.2.5. Conclusions des régulations.

L'étude des séquences promotrices a permis de montrer que CLOCK/BMAL1 n'est pas l'unique activateur de la transcription des gènes horloges mais que d'autres protéines (CREB, DBP, E4BP4) jouent également un rôle important. La présence des séquences RORE, E-box, DBP/E4BP4-binding site et surtout les diverses combinaisons possibles entre elles, pourraient être à la base des activations différentielles des gènes horloges (Yamamoto *et al.*, 2004). Il est également fort possible que des protéines comme la NOCTURNIN ou des RBP aient un rôle régulateur pour la quantité d'ARNm produite mais aussi pour l'efficacité de la traduction. Puis, les interactions entre les PERs et CRYs interviennent dans la régulation de leur localisation nucléo-cytoplasmique comme dans leur dégradation par le complexe du protéasome (Miyazaki *et al.*, 2001 ; Yagita *et al.*, 2002). De même, la formation de dimères CLOCK/BMAL1 contrôle en partie leur localisation, leur phosphorylation et leur dégradation (Kondratov *et al.*, 2003). Ainsi, l'action et la demi-vie des protéines horloges sont sous contrôle partiel de nombreuses protéines. L'action d'autres protéines intervenant à différents niveaux, permet donc un **fonctionnement spatio-temporel des boucles de régulation afin d'obtenir une période proche de 24h**. Ces régulations spatio-temporelles schématisées [figure 19](#) ont un rôle clé dans la création des oscillations circadiennes. Par exemple, la mutation du gène codant la CKI ϵ , permettant une accumulation plus rapide des protéines PERs et CRYs, induit une réduction de la période circadienne chez le mutant *tau* (Lowrey *et al.*, 2000). C'est donc l'ensemble des régulations et les équilibres entre action et dégradation qui permettent des adaptations fines de l'horloge moléculaire des SCN. Ces adaptations permettent l'apparition des décalages de phase entre les pics d'ARNm des différents gènes horloges de la boucle négative qui sont pourtant tous, sous contrôle de CLOCK/BMAL1. La régulation des boucles met déjà en jeu de nombreux mécanismes et de futures études viendront certainement les compléter (compliquer ?) davantage.

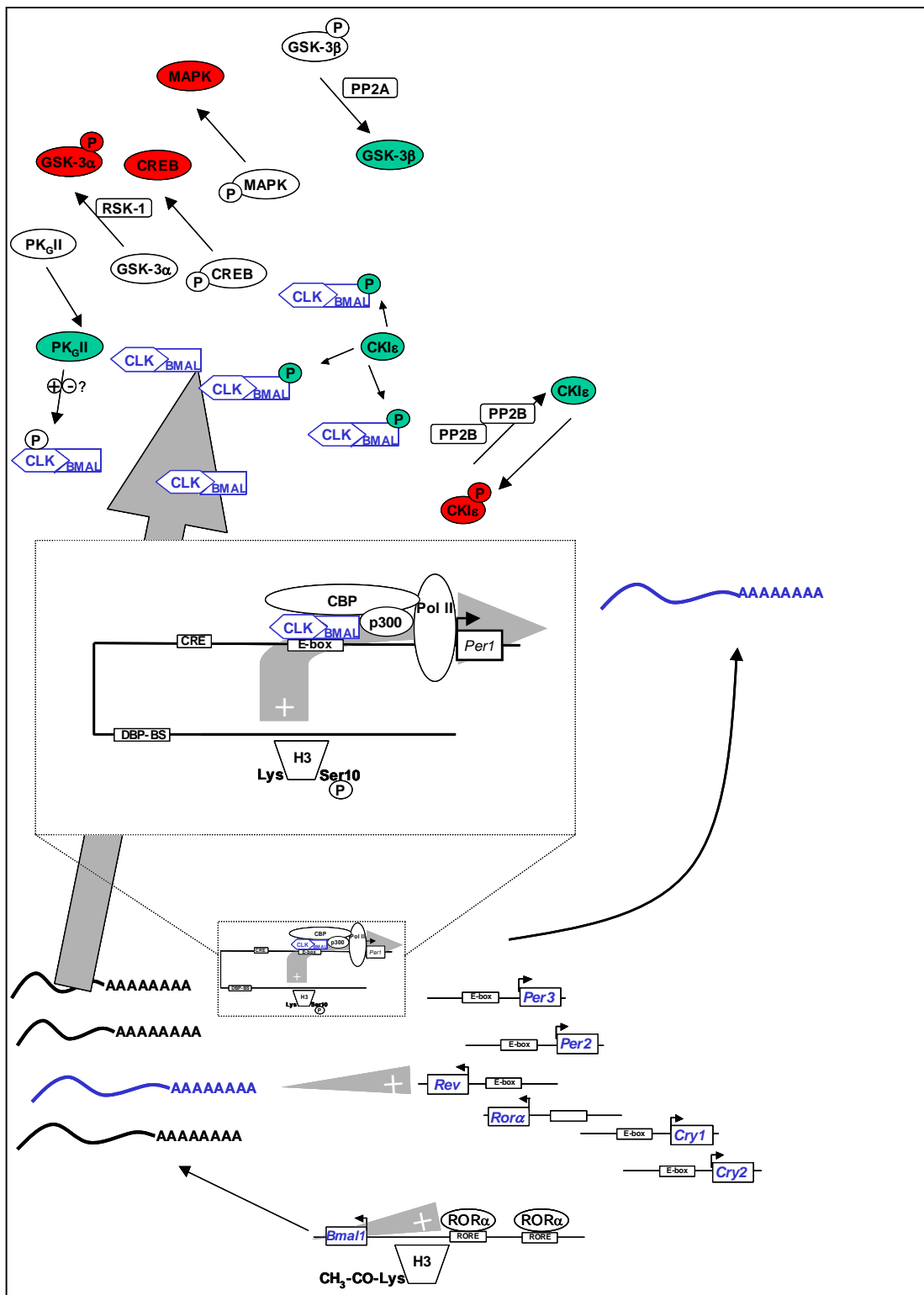


Figure 19 : Régulations spatio-temporelles des produits des gènes horloges à la base de la rythmicité, partie 1/4. Accumulation de dimères CLOCK/BMAL1.

Dans le cas des ARNm et des protéines des gènes horloges, la couleur bleue indique une synthèse *de novo*. Les couleurs verte et rouge indiquent les états d'activation et d'inactivation, respectivement. De ZT21 à ZT3 environ, les protéines BMAL1 s'accumulent, permettant la formation de dimères CLOCK/BMAL1. La CKIε permet la phosphorylation de BMAL1 augmentant ainsi son activation. La PKcII phosphoryle CLOCK mais la conséquence est incertaine. Puis, ce dimère pénètre dans le noyau et permet le début de la transactivation. De ce fait, les ARNm de *Rev-erba* et de *Per1* commencent à s'accumuler.

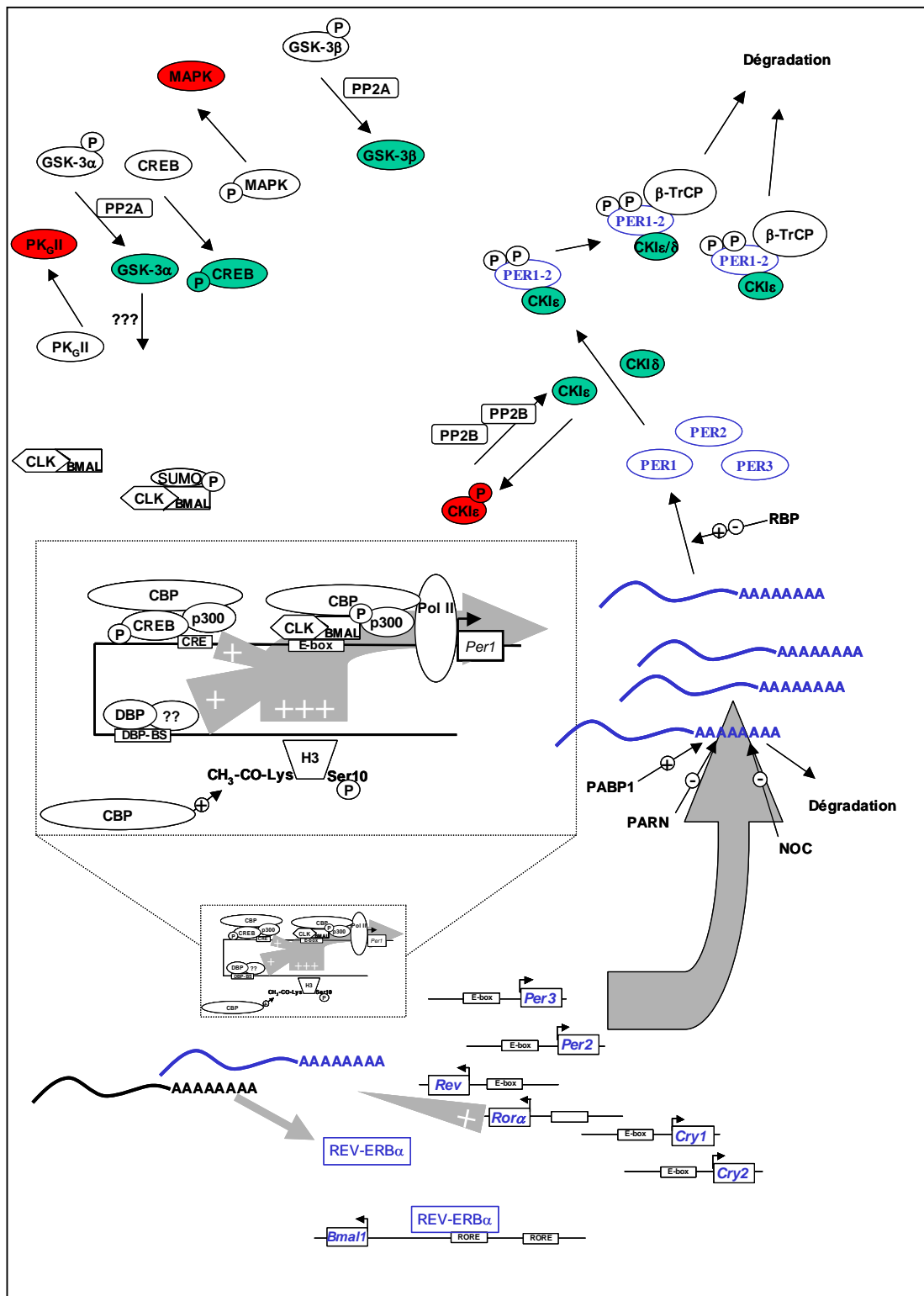


Figure 19 : Régulations spatio-temporelles des produits des gènes horloges à la base de la rythmicité, partie 2/4 . Accumulation des produits des gènes *Pers*.

De ZT3 à ZT9, on note au niveau des promoteurs (montré pour *Per1*) une accumulation des effets activateurs de la transcription : (1) maximum de fixation de Pol II ; (2) fixation des complexes p300/CLOCK/BMAL1/CBP ; (3) fixation de p300/P-CREB/CBP ; (4) fixation de DBP et (5) l'H3 est phosphorylée en Ser10 et acétylée en Lys4/9 par des MAPK et CBP, respectivement, ce qui favorise la trans-activation. Ainsi, l'accumulation des ARNm de *Per1* puis de *Per3* et *Per2*, en fonction des activités (présumentes) de PABP1, PARN et NOC, permet la formation des protéines PER1 à 3, en fonction de l'activité de la RPB. Celles-ci se dimérisent, sont phosphorylées et peuvent être dégradées. Parallèlement, les protéines REV-ERB α s'accumulent tout comme les ARNm de *Rora*.

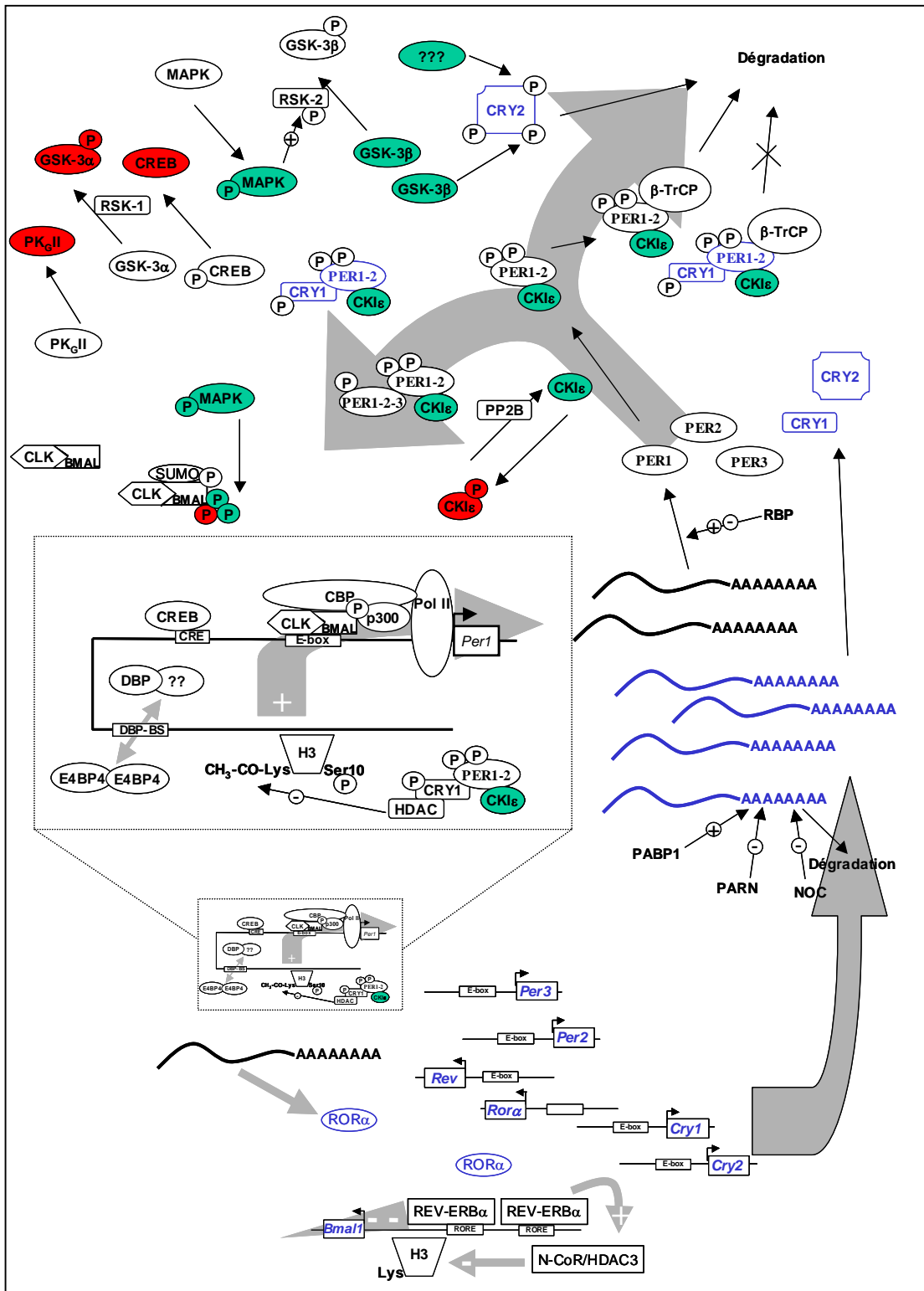


Figure 19 : Régulations spatio-temporelles des produits des gènes horloges à la base de la rythmicité, partie 3/4. Accumulation des dimères PERs/CRYs.

De ZT9 à ZT15, on assiste aux pics de présence des ARNm de *Cry1* et *Cry2*. Les protéines CRYs et PERs s'accumulent et sont phosphorylées. Petit à petit, l'équilibre entre l'accumulation de protéines et leurs dégradations s'inverse. La transactivation diminue, CREB n'est plus phosphorylée et DBP est en compétition avec E4BP4. Concernant les protéines BMAL1, elles sont SUMOylées et phosphorylées par les MAP-K (alors à son maximum d'activité) permettant respectivement la dégradation et l'inactivation de BMAL1. REV-ERB α inhibe fortement la transcription de *Bmal1* mais les protéines *ROR* α s'accumulent.

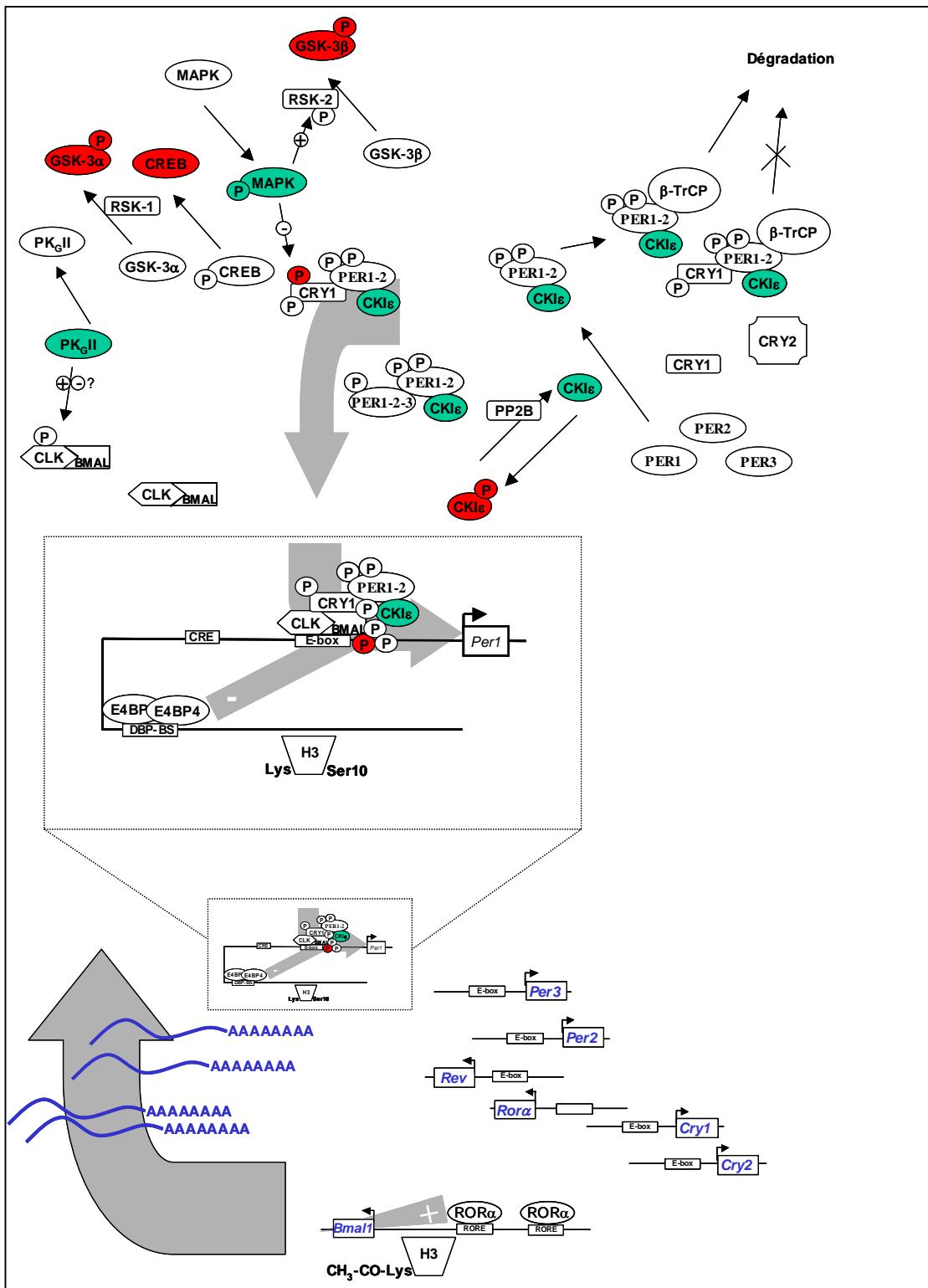


Figure 19 : régulations spatio-temporelles des produits des gènes horloges à la base de la rythmicité, partie 4/4. Inhibition de la transactivation et retour au début du cycle.

De ZT15 à 21, les complexes PERs/CRYs sont fortement accumulés dans le noyau où ils inhibent leur propre transcription ce qui est favorisé par les homodimères d'E4BP4. De plus, la GSK-3β présente son état d'inactivation le plus fort (grâce au pic d'activité des P-MAPK) n'inhibant donc plus CRY2. A l'inverse, les P-MAPK permettent d'inactiver les CRYs. Les protéines RORα étant fortement représentées, elles permettent l'activation de la transcription de *Bmal1* dont les ARNm s'accumulent. Enfin, les protéines PERs, CRYs vont être dégradées, c'est le début d'un nouveau cycle.

La description des boucles, dans cette figure, doit cependant être interprétée avec quelques précautions. (1) Une partie des phénomènes décrits ici ne sont pas, à l'heure actuelle, mis en évidence dans les SCN, et les données à partir de cultures cellulaires (essentiellement de fibroblastes) ou *in vivo*, à partir de mesures effectuées dans les hépatocytes ne suffisent pas pour rendre ces mécanismes universels. (2) Les résultats proviennent de cultures réalisées à partir de différentes espèces, nous n'avons pas tenu compte de cette diversité pour la réalisation de cette figure. (3) Les boucles ne tiennent pas non plus compte de la localisation du neurone. Or, nous avons vu que les SCN ne sont pas un tissu homogène et, tant au niveau des tranches horaires que des mécanismes proposés, des différences entre populations de cellules des SCN doivent exister. Enfin, (4) Certains mécanismes, encore mal connus, n'ont été décrits comme efficaces que sur l'une ou l'autre des protéines horloges. La figure présente de tels mécanismes, il ne faut donc pas interpréter une absence de flèche comme étant la démonstration qu'il n'y a pas d'effet. Ils peuvent exister mais ne sont pas démontrés. Enfin, (5), plusieurs mécanismes supposés sont décrits ici mais restent à être mis clairement en évidence.

Cependant, l'intérêt de cette figure est de pouvoir rapporter les différents phénomènes observés, quelque soit l'espèce ou le tissu utilisé. Cette synthèse a pour but de présenter un mécanisme d'action général, permettant d'avoir une base de travail pour formuler de nouvelles hypothèses.

1.4. SYNCHRONISATION DE L'HORLOGE PRINCIPALE.

L'information photique est tout d'abord perçue par la rétine puis transmise aux SCN en suivant différentes voies. La seule voie directe dont les neurotransmetteurs principaux sont le glutamate et le PACAP, forme le RHT. Une deuxième voie provient des IGL ("feuillets intergénéculés latéraux") qui libèrent du NPY, de l'enképhaline et du GABA au niveau des SCN via le tractus géniculohypothalamique. Enfin, la troisième voie provient du noyau du raphé médian avec, pour neurotransmetteur, la sérotonine. Cependant, le RHT est la voie principale de l'entraînement par la lumière (Johnson *et al.*, 1988a, b), les deux autres voies n'intervenant que pour moduler la réponse à la lumière (Harrington & Rusak, 1986). De ce fait, ce chapitre ne concernera que les données concernant le rôle du RHT dans l'entraînement par la lumière et les mécanismes impliqués au niveau des SCN.

1.4.1. Au niveau physiologique.

Nous avons vu que l'information photique est transmise aux SCN via le RHT. A l'instar d'un créneau de lumière, une stimulation du RHT aura des effets sur l'organisme si cette stimulation est effectuée pendant la nuit (subjective) et sera sans effet si elle est effectuée pendant le jour (subjectif) (Gillette *et al.*, 1995). Une exposition à la lumière pendant la nuit subjective aura pour conséquences l'apparition de retard de phase de l'activité locomotrice (stimulations en début de nuit) ou d'avance de phase (stimulations en fin de nuit) qui sont proportionnels à l'intensité lumineuse et à la durée d'exposition (Nelson & Takahashi, 1991 ; Meijer *et al.*, 1992). Ainsi, en fonction du moment de la stimulation, une PRC ("Courbe de réponse de phase") à une stimulation photique peut-être établie. La [figure 20](#) présente un cas général mais il existe cependant de petites différences dans la forme exacte de la courbe entre les espèces (DeCoursey, 1960 ; Daan & Pittendrigh, 1976 ; Takahashi & Zatz, 1982).

1.4.2. Au niveau cellulaire.

Un créneau lumineux a pour effet d'augmenter la concentration en glutamate extracellulaire au niveau des SCN (Honma *et al.*, 1996a) et environ 30% des neurones des SCN du rat, du hamster syrien et de l'écureuil terrestre à treize bandes (*Spermophilus tridecemlineatus*), sont

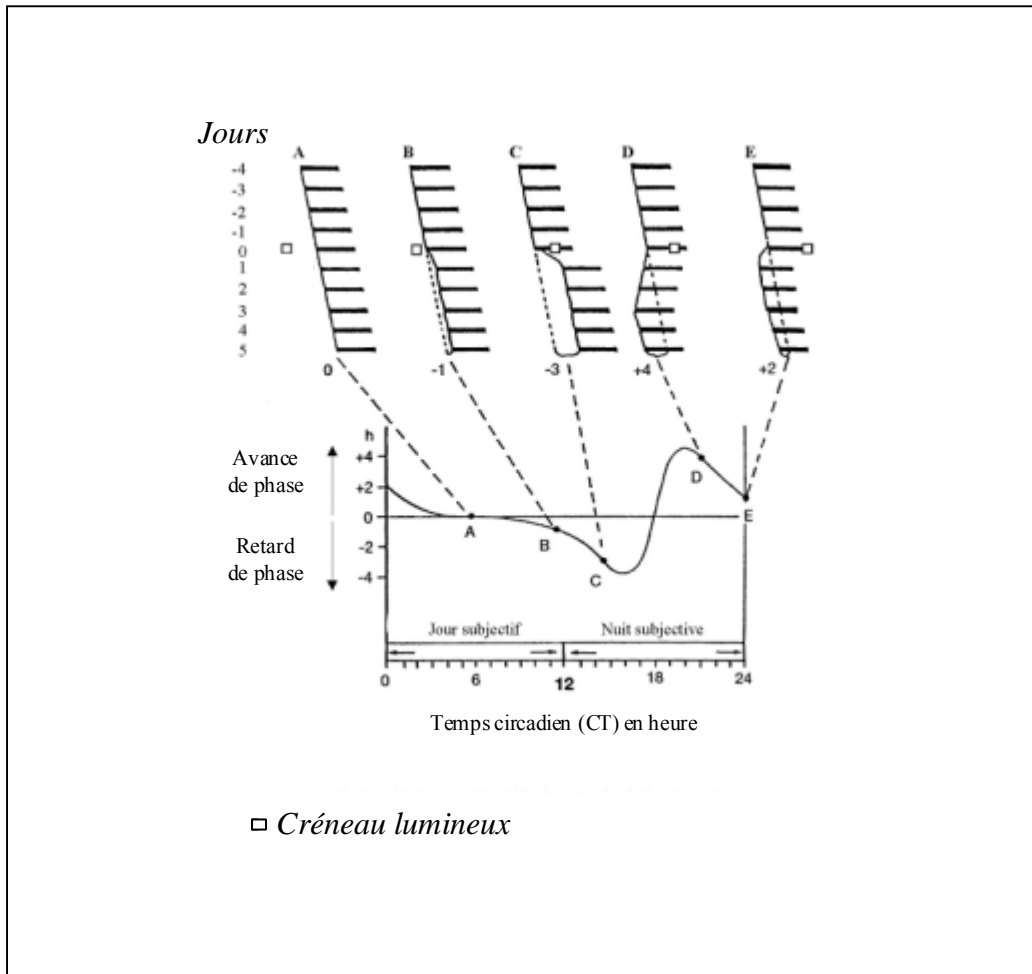


Figure 20 : La lumière induit des décalages de phase de l'activité locomotrice.

L'application d'un créneau lumineux (carré) en fin ou en début de nuit induit respectivement une avance et un retard de phase de l'activité locomotrice (barres horizontales noires). Par contre, l'application du créneau de lumière pendant le jour subjectif est sans effet. Le report de l'amplitude et du sens des décalages de phase en fonction de l'heure d'application de la lumière, permet d'établir une courbe de réponse de phase.

sensibles à la lumière et la majorité sont activés (Groos & Mason, 1978 ; Meijer *et al.*, 1986 ; Meijer *et al.*, 1989). L'application ICV de MK801, antagoniste des récepteurs NMDA, permet d'inhiber le décalage de phase de l'activité locomotrice normalement induit par un créneau lumineux (Colwell *et al.*, 1990 ; Shibata *et al.*, 1994 ; Akiyama *et al.*, 1999). *In vitro*, des décalages de phase de l'activité électrique des cellules de SCN sont obtenus par application de glutamate qui permet une entrée de Ca^{++} dans les neurones des SCN (van den Pol *et al.*, 1992, Kim Do *et al.*, 2005 ; Lundkvist *et al.*, 2005). Ces décalages sont abolis par l'inhibition de la stimulation de la NO synthase ce qui suggère également un rôle pour le NO en aval de l'action du glutamate (Ding *et al.*, 1994 ; Shibata *et al.*, 1994 ; Watanabe *et al.*, 1994). Bien qu'un créneau lumineux appliqué en jour subjectif ne provoque pas de décalage de phase de l'activité locomotrice, il induit une augmentation de la fréquence de décharges des neurones. Cependant, cette augmentation est faible par rapport à celle obtenue à la suite d'une activation pendant la nuit subjective. Ceci peut-être corrélé au fait que pendant le jour, l'activité de base des neurones est élevée, contrairement à la nuit où elle est faible (Meijer *et al.*, 1998).

Chez les souris *TrkB^{+/-}* (mutation du gène codant le récepteur à tyrosine kinase B), présentant une diminution des quantités de ce récepteur localisé sur le RHT (Allen & Earnest, 2005), les décalages de phases obtenus pour l'activité locomotrice sont plus faibles en amplitude alors qu'aucune différence de comportement locomoteur n'est observé en cycles LD et en DD par rapport aux souris sauvages (Allen *et al.*, 2005). L'application d'inhibiteurs de ce récepteur permet de bloquer les décalages de phase (Liang *et al.*, 2000). C'est un récepteur à haute affinité pour le BDNF ("Brain-derived neurotrophic factor") dont l'application pendant le jour subjectif permet une réponse à la lumière (Liang *et al.*, 2000). Ainsi, le BDNF, d'expression rythmique dans les SCN avec un pic de nuit (Liang *et al.*, 1998) jouerait un rôle dans la fenêtre de sensibilité des SCN à un créneau lumineux.

Dans le paragraphe suivant, nous verrons qu'un créneau lumineux permet d'induire notamment l'expression de *Per1*. Cependant, cette induction ne se fait pas dans l'ensemble des SCN du rat mais semble être restreinte à la partie vlSCN (PER1-ir, Sumova & Illnerova, 2005) et plus particulièrement aux cellules à VIP (ARNm de *Per1*, Dardente *et al.*, 2002b). Un pic d'ARNm de *Per1* dans le dmSCN est ensuite trouvé plus tardivement (Hamada *et al.*, 2004) et pourrait être dû à l'entraînement du dmSCN par le vlSCN par exemple par le VIP. De plus, les mutants *Vipr2^{-/-}*, ne présentent plus de réponse à la lumière ce qui met en évidence un rôle de ce peptide (Harmar *et al.*, 2002).

La sous régionalisation des SCN par les neurones à CALB aurait également un rôle particulier. Alors que l'expression de la *Calbindin* est non rythmique, il existe un rythme

circadien de présence de la CALB dans le noyau (Hamada *et al.*, 2003). Par injection d'oligonucléotides anti-*Calbindin* dans le troisième ventricule, les décalages de phase (tout comme l'activation de l'expression de *Per1*) sont réduits de façon dose-dépendante (Hamada *et al.*, 2003). Le contrôle de la fenêtre de sensibilité des SCN à un créneau lumineux ferait donc intervenir la CALB.

1.4.3. Au niveau moléculaire.

L'application d'un créneau lumineux pendant la nuit (subjective) permet une augmentation de du taux d'histone H3 phosphorylée de façon spécifique aux SCN (Crosio *et al.*, 2000). On peut alors supposer que cette phosphorylation permet en partie l'activation de la transcription de gènes spécifiques intervenant dans les phénomènes de décalage de phase. Plusieurs études suggèrent que les gènes *Per1* et *Per2* jouent un rôle important dans l'apparition d'avance et de retard de phase de l'activité locomotrice en réponse à un créneau lumineux appliqué pendant la phase nocturne. Les niveaux d'ARNm et de protéine de *Per1* augmentent à la suite d'une exposition à la lumière ou, *in vitro*, par application de glutamate (Albrecht *et al.*, 1997 ; Shearman *et al.*, 1997 ; Shigeyoshi *et al.*, 1997 ; Takumi *et al.*, 1998a ; Zylka *et al.*, 1998 ; Akiyama *et al.*, 1999 ; Field *et al.*, 2000 ; Miyake *et al.*, 2000 ; Yan & Silver, 2002). Le même effet est obtenu pour *Per2* lorsque l'exposition à la lumière a lieu en début de nuit (induisant des retards de phase) mais pas lorsqu'elle est réalisée en fin de nuit (induisant alors des avances de phase) (Shearman *et al.*, 1997 ; Takumi *et al.*, 1998a ; Yan & Silver, 2002). L'implication de *Per1* et *Per2* a été confirmée d'une part, en utilisant des α ODN dirigés contre eux, qui inhibent alors l'apparition des décalages de phase (Akiyama *et al.*, 1999 ; Wakamatsu *et al.*, 2001 ; Tischkau *et al.*, 2003a) et d'autre part, grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées *mPer1^{Brdm1}* et *mPer2^{Brdm1}* qui ne présentent plus d'avance et de retard de phase, respectivement (Albrecht *et al.*, 2001). De ces diverses études, il découle que **les décalages de phases de l'activité locomotrice induits par des créneaux lumineux pendant la nuit seraient dus à *Per1* pour les avances de phase et à *Per1* et *Per2* pour les retards de phase**. Les phénomènes décrits ci-dessus restent cependant soumis à discussion. En effet, les études réalisées par Cermakian *et al.* (2001) et Bae & Weaver (2003) montrent que ni *Per1* ni *Per2* ne seraient nécessaires à ces décalages. Dans la première étude, l'utilisation de souris *Per1^{-/-}* a permis de mettre en évidence que les décalages de phase induits par un créneau lumineux à CT14 ou à CT20 sont identiques à ceux décrits chez les

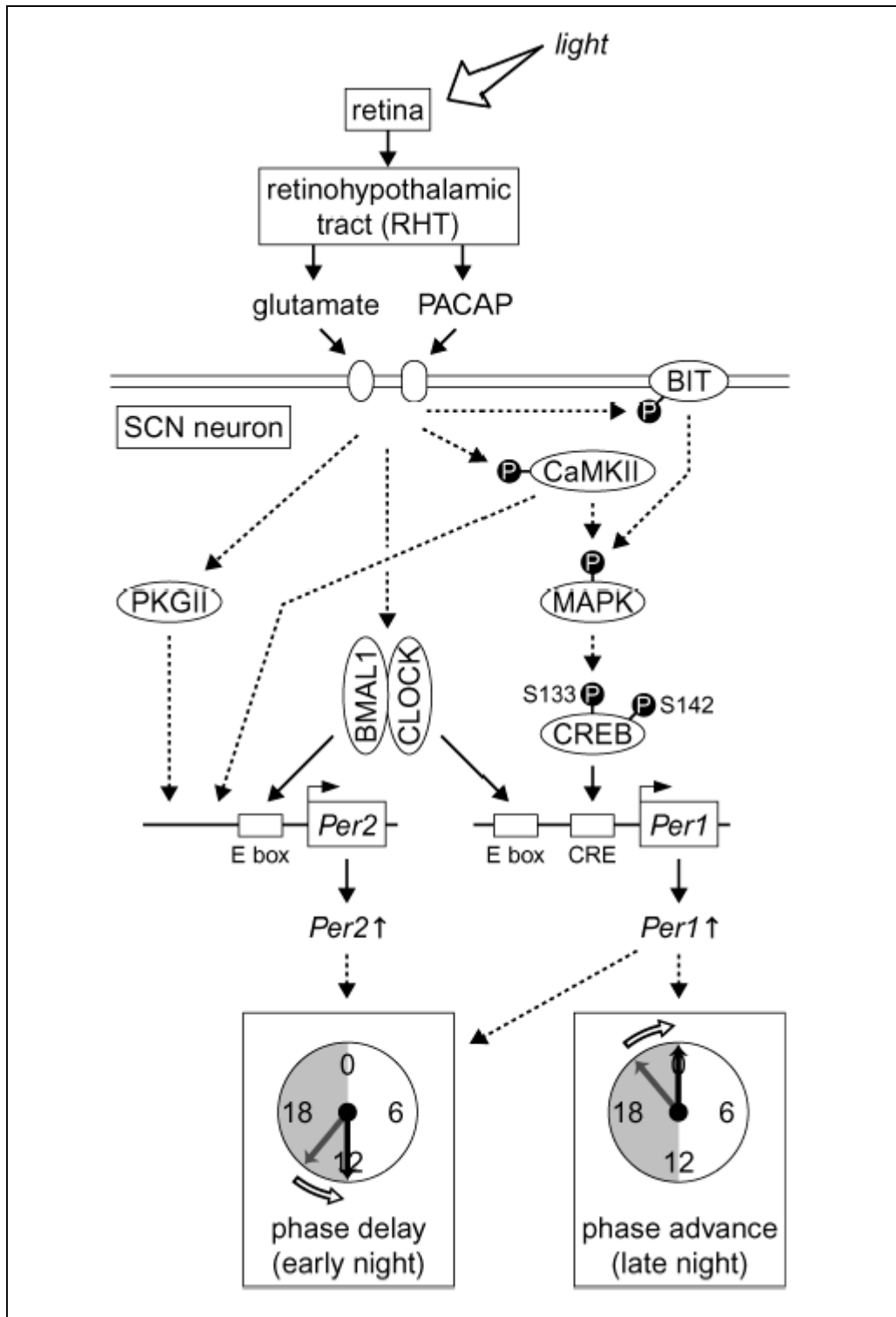


Figure 21 : Représentation schématique des voies de transduction dans les SCN après l'application d'un créneau lumineux pendant la nuit (d'après Hirota and Fukada, 2004).

Les lignes continues et pointillées indiquent les effets directs et indirects respectivement. BIT, brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs; CaMKII, Calcium/Calmoduline kinase II; CRE, cAMP response element; CREB, CRE-binding protéin; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating peptide; PKGII, cGMP-dependent protein kinase II.

souris sauvages. Ce résultat est confirmé dans la seconde étude où les auteurs démontrent que les retards de phases sont également présents chez des souris *Per2*^{-/-}.

Une stimulation photique pendant la phase nocturne permet un flux entrant de Ca⁺⁺ dans les cellules des SCN (via les récepteurs NMDA ; Ding *et al.*, 1997; Schurov *et al.*, 1999) ce qui permet l'activation de la voie AMPc, avec pour conséquences la phosphorylation de la protéine CREB (P-CREB) sur les Ser133 (Ginty *et al.*, 1993) et Ser142 (Gau *et al.*, 2002). P-CREB active la transcription de la galactosidase (Obrietan *et al.*, 1999) chez des souris transgéniques possédant un gène rapporteur CRE-β-galactosidase (Impey *et al.*, 1996). Nous avons vu que le gène *Per1* possède dans son promoteur une séquence CRE (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002), sa transcription à la suite d'un créneau lumineux semble donc activée par P-CREB. De plus, l'application d'oligonucléotides se fixant sur la séquence CRE, inhibe l'apparition d'ARNm de *Per1* (Tischkau *et al.*, 2003a). La [figure 21](#), d'après Hirota & Fukada (2004), présente ce mécanisme d'action. Une mutation de la protéine CREB (mutation de Ser142 en Ala) permet d'inhiber l'activation de *Per1* mais pas celle de *Per2*, ce qui prouve que les mécanismes de leur activation par le glutamate sont différents (Gau *et al.*, 2002). **La voie de transduction permettant l'apparition d'avances de phase et l'augmentation de produits du gène *Per1* fait donc intervenir la protéine CREB.**

Les phénomènes moléculaires à l'origine de l'augmentation des ARNm de *Per1* par P-CREB, à la suite d'un créneau de lumière, restent sujet à controverse. La [figure 22](#) présente une schématisation de l'ensemble de ces données. De manière générale, la voie CREB/CRE peut être activée par différentes kinases comme la PK_A ("Protéine kinase dépendante du cAMP"), la CaMKII ("Ca⁺⁺/Calmoduline kinase II") et les MAPK (Gonzalez & Montminy, 1989 ; Sheng *et al.*, 1991 ; Xing *et al.*, 1996 ; Impey *et al.*, 1998). Il a été montré par l'inhibition de la PK_A, que cette dernière ne joue aucun rôle dans l'apparition d'avances de phase (Mathur *et al.*, 1996). A l'inverse, la CaMKII et les MAPK semblent impliqués dans ce phénomène. Cependant, pour certains auteurs, l'activation par la phosphorylation de CREB ferait intervenir la CaMKII, mais sans l'intervention des MAPK (Yokota *et al.*, 2001) alors que pour d'autres, l'activation des MAPK par la CaMKII (Chen *et al.*, 1998) serait un élément essentiel à l'apparition des décalages de phase (Butcher *et al.*, 2002). Mais, d'autres données sont également à prendre en compte. D'une part, la PK_C permet non seulement d'augmenter les taux de transcrits de *Per1* (Akashi & Nishida, 2000) mais aussi d'activer des MAPK (Cobb *et al.*, 1991; Nishida & Gotoh, 1993). De plus, l'activation de la voie PK_C provoque des avances de phase (Biello *et al.*, 1997 ; Schak & Harrington, 1999). Il reste cependant à

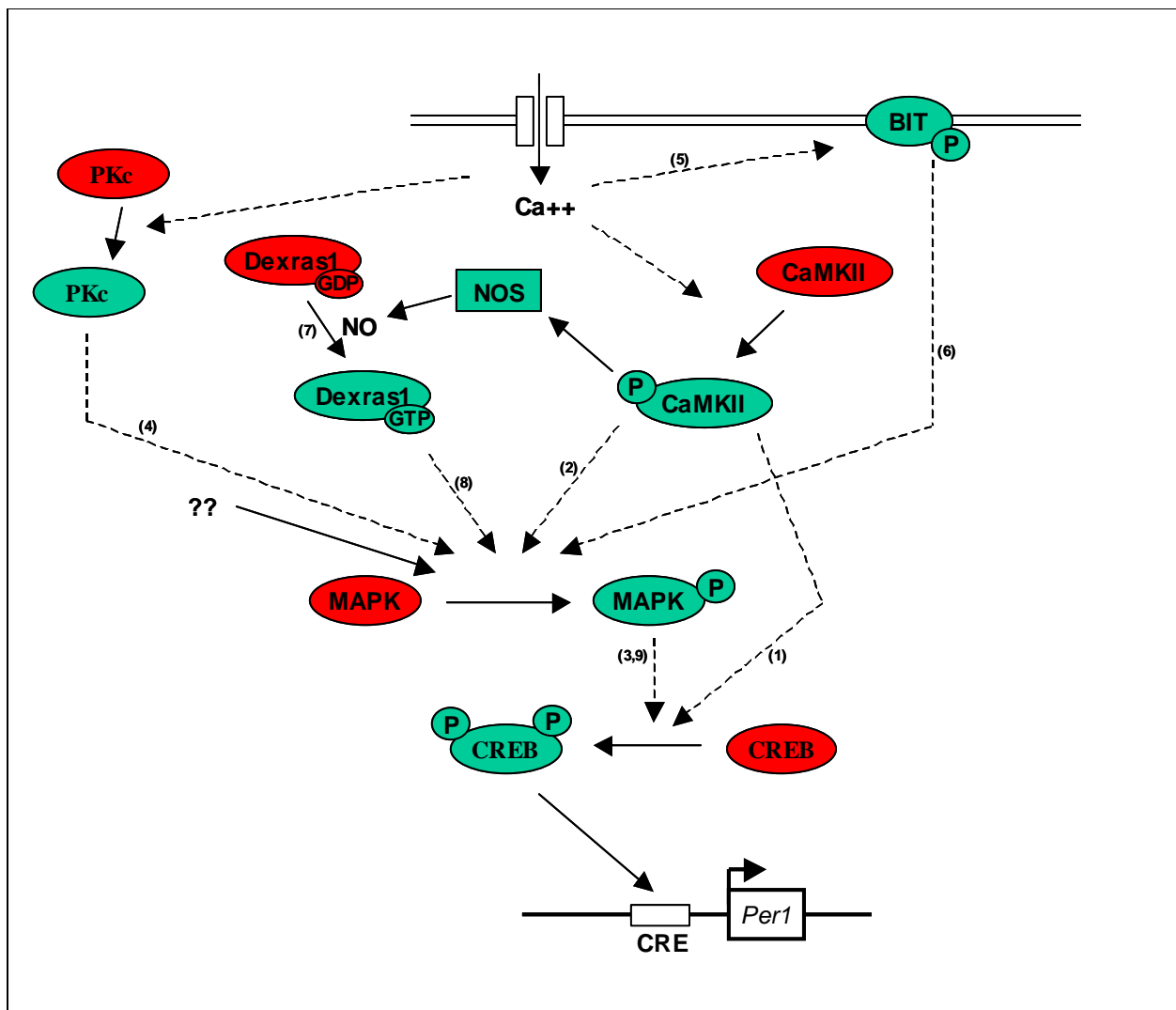


Figure 22: Synthèse bibliographique schématique des voies de transduction conduisant à l'activation des MAPK puis de *Per1* lors d'un créneau lumineux provoquant une avance de phase de l'activité locomotrice.

Les lignes continues et pointillées indiquent les effets directs et indirects respectivement. La couleur rouge présente l'état d'inactivation et la verte d'activation de protéines. BIT, brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs; CaMKII, Calcium/Calmoduline kinase II; CRE, élément de réponse à l'AMPc; CREB, CRE-binding protéin; MAP, *mitogen activated* proteins; MAPK, kinase activant les MAP; NO, monoxyde d'azote; NOS, NO synthase.

(1) Yokota *et al.*, 2001; (2) Chen *et al.*, 1998 ; (3) Butcher *et al.*, 2002 ; (4) Cobb *et al.*, 1991; Nishida and Gotoh, 1993 ; Akashi & Nishida, 2000; (5) Nakahata *et al.*, 2000 ; (6) Nakahata *et al.*, 2003 ; (7) Fang *et al.*, 2000 ; (8) Ding *et al.*, 1994, 1997 ; Gau *et al.*, 2002 ; (9) Xing *et al.*, 1998 ; Impey *et al.*, 1998.

démontrer que la PK_C peut être activée par un créneau lumineux. D'autre part, la lumière induit la phosphorylation d'une glycoprotéine membranaire, la BIT ("Brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs") dont l'une des conséquences est l'activation de la voie des MAPK (Nakahata *et al.*, 2000, 2003). De plus, l'activation de *Per1* par la voie des MAPK pourrait faire intervenir la protéine G nommée DEXRAS1 ("Dexamethasone-induced RAS protein 1"). Cette protéine présente un pic d'activité en début de nuit et pourrait donc être le lien entre la CaMKII et les MAPK. En effet, la lumière provoque au sein des SCN un flux entrant de Ca⁺⁺ qui permet la libération du monoxyde d'azote NO (par l'action de la NO synthase complexée avec la CaMKII). L'oxyde nitrique se fixe sur la DEXRAS1 ce qui provoque son activation par échange GDP-GTP (Fang *et al.*, 2000). Une fois active, elle permet la phosphorylation donc l'activation des MAPK (Ding *et al.*, 1994, 1997 ; Gau *et al.*, 2002). Puis, les P-MAPK permettraient la phosphorylation de CREB (Xing *et al.*, 1998 ; Impey *et al.*, 1998). Enfin, les MAPK peuvent également activer les facteurs de transcription de type AP-1 (Whitmarsh & Davis, 1996). Le promoteur de *Per1* contenant un site de fixation AP-1, cette voie pourrait donc également participer. **On peut donc penser que les créneaux de lumière permettant l'activation de CREB, de *Per1* et provoquant des avances de phase feraient intervenir la voie des MAPK. Et, en amont des MAPK, différents acteurs interviendraient dont la CaMKII, la BIT, la DEXRAS1 et peut-être d'autres encore.**

La voie de signalisation à l'origine de l'augmentation des niveaux des ARNm de *Per2* en relation avec les retards de phase est moins bien élucidée. Les différentes hypothèses sont représentées [figure 23](#). Il est possible que la transactivation de *Per2* soit sous la dépendance de la PK_{GII}. En effet, chez les souris mutantes pour PK_{GII}, un créneau de lumière ne peut pas provoquer de retards de phase mais seulement des avances de phases identiques à celles des souris sauvages (Oster *et al.*, 2003). A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence la nécessité de la voie cGMP-PK_G pour l'apparition d'avances de phase (Gillette & Mitchell, 2002 ; Tischkau *et al.*, 2003b). L'application d'oligonucléotides de PK_{GII} sur des tranches de SCN provoque des retards de phase (Tischkau *et al.*, 2004). De plus, une augmentation du Ca⁺⁺ intracellulaire par l'action des récepteurs ryanodine participerait également aux retards de phase mais cette voie reste hypothétique (Ding *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 1998). L'activation plausible par le Ca⁺⁺ de la PK_C (sous dépendance du Ca⁺⁺) n'est cependant pas la bonne hypothèse car la PK_C ne peut pas provoquer de retard de phase (Schak & Harrington, 1999). La CaMKII semble elle aussi jouer un rôle car son inactivation a pour conséquence une

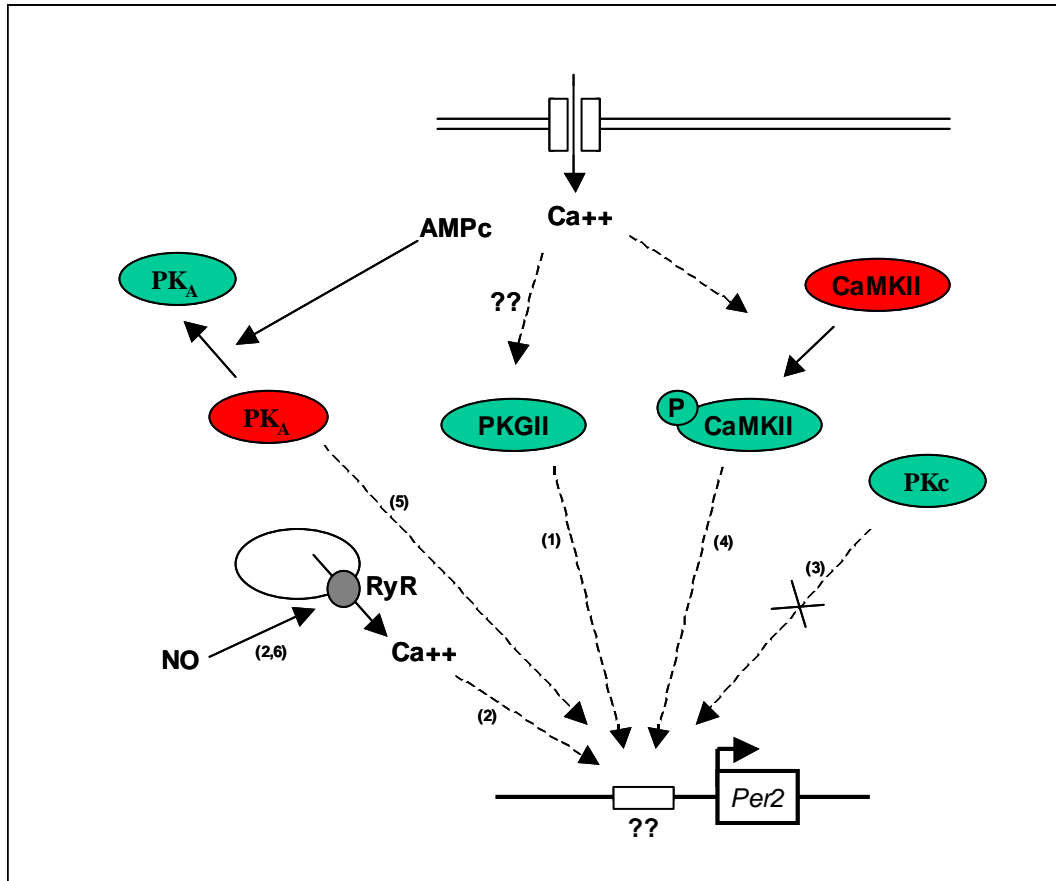


Figure 23 : Représentation schématique des voies de transduction conduisant à l'activation de Per2 lors d'un créneau lumineux provoquant un retard de phase de l'activité locomotrice.

Les lignes continues et pointillées indiquent les effets directs et indirects respectivement. La couleur rouge présente l'état d'inactivation et la verte d'activation de protéines. CaMKII, Calcium/Calmoduline kinase II; PK_A, cAMP-dependent protein kinase; PKGII, cGMP-dependent protein kinase II; RyR, ryanodine receptor.

(1) Oster *et al.*, 2003; Tischkau *et al.*, 2004; (2) Ding *et al.*, 1998; (3) Schak & Harrington, 1999; (4) Yokota *et al.*, 2001; (5) Lee *et al.*, 1999; (6) Xu *et al.*, 1998.

diminution de l'amplitude du retard de phase (Golombek & Ralph, 1994 ; Yokota *et al.*, 2001). Enfin, nous avons vu précédemment que la lumière permet une augmentation en cAMP ce qui provoque également l'activation de la PK_A (via l'adénylate cyclase, Medanic & Gillette, 1992). Or, c'est une inhibition et non une activation de la PK_A qui permet l'apparition de retards de phase (Lee *et al.*, 1999). **De nombreux points restent donc à éclaircir pour rendre compte des phénomènes de retards de phase.**

En conclusion des rôles de *Per1* et de *Per2* dans les phénomènes de décalages de phase induits par la lumière, il apparaît clairement que de multiples acteurs participent à leur activation. Cependant, de nombreuses divergences existent et devront être élucidées par de futures études. Elles devront permettre de rendre compte des différents effets observés. Par exemple, l'inactivation des MAPK permet de diminuer les avances et les retards de phase (Butcher *et al.*, 2002 ; Coogan & Piggins, 2003) alors que l'inactivation de la CaMKII ne diminue que les retards de phase (Yokota *et al.*, 2001). Ceci pourrait être dû au fait de la redondance des mécanismes permettant l'apparition d'avances de phase par rapport à ceux permettant des retards de phase. De plus, l'induction de *Per1* fait intervenir P-CREB, reconnaissant le site promoteur 5'-TGACGTCA-3' (voir [paragraphe A.1.3.2.1.](#)) mais l'induction de *Per1* par la CaMKII est bloquée par la mutation d'une séquence différente (5'-GAGGGG-3') située en amont de l'exon 1_B du promoteur de *Per1* (Nomura *et al.*, 2003). Ce résultat met en évidence le fait que P-CREB ne serait pas le seul acteur de cette induction et que d'autres acteurs encore inconnus, sont nécessaires à l'activation par P-CREB.

Dans le but de montrer que d'autres gènes horloges prennent part aux phénomènes de décalage de phase, Tamaru et coll. (2000) ont montré que BMAL1 serait diminué par la présence de lumière pendant la nuit, mais ce résultat n'a cependant pas été confirmé par la suite (von Gall *et al.*, 2003). De la même manière, il a été montré que la transcription de *Cry1* comme celle de *Cry2* ne prendrait pas part aux phénomènes de décalages de phases (Okamura *et al.*, 1999). Le gène *Clock*, bien que ni activé ni inhibé par la lumière, pourrait jouer un rôle. Chez les souris *Clock^{mut}*, un créneau lumineux provoque une augmentation des niveaux de *Per1* plus faible que chez les souris sauvages (Shearman & Weaver, 1999) et nous avons vu précédemment ([chapitre A.1.3.1.](#)) qu'en terme d'activité locomotrice, ces souris sont moins sensibles à un créneau lumineux.

1.5. DES HORLOGES...EN PERIPHERIE.

Au [chapitre A.1.2.7.](#), nous avons vu que les SCN contrôlent les sécrétions hormonales, notamment de glucocorticoïdes, ce qui laisse supposer que, par l'intermédiaire de diverses hormones, les SCN contrôlent ou imposent leur rythmicité à l'ensemble de l'organisme. L'une des plus belles démonstrations d'entraînement des rythmes en périphérie par des facteurs circulants a été apportée en 2002 avec une expérience où Panda et coll. ont implanté en sous-cutané des fibroblastes embryonnaires de souris (FES) sauvages ou de souche *Per1*^{-/-} à des souris de souches sauvage, *Per1*^{-/-} ou *Clock*^{mut}. Dans tous les cas, la période des rythmes d'expression de *Per2* dans les FES est égale à celle du receveur et non du donneur. Comme aucune connexion directe n'est possible entre les cellules de l'implant et celles de l'animal receveur, car les FES sont encapsulées dans du collagène, l'entraînement des rythmes de *Per2* dans les FES est dû à la présence de facteurs circulants. Dans cette partie, nous verrons donc comment les organes périphériques peuvent être entraînés par des facteurs circulants puis quelle est l'implication des SCN dans le fonctionnement journalier de ces organes et enfin nous verrons un exemple du contrôle d'une fonction périphérique par les SCN.

1.5.1. Des oscillateurs périphériques.

L'expression des gènes horloges n'est pas limitée aux SCN, et de nombreuses études rapportent une expression rythmique de ces gènes en dehors des SCN (Akhtar *et al.*, 2002 ; Panda *et al.*, 2002a ; Ueda *et al.*, 2002 ; Storch *et al.*, 2002 ; Kita *et al.*, 2002 ; Hastings *et al.*, 2003). Des décalages de phase des pics d'ARNm des gènes horloges ont été observés en fonction du tissu ou de l'organe. Ainsi, l'acrophase du rythme de présence des ARNm de *Per1* se situant en début de jour dans les SCN, les valeurs maximales sont obtenues au même moment dans la *Pars tuberalis* de l'adénohypophyse (Messenger *et al.*, 1999), mais seulement 7h après dans les poumons (Yamazaki *et al.*, 2000) et de 4 à 10h après, en fonction des études, dans le foie et dans le cœur (Balsalobre *et al.*, 1998 ; Yamazaki *et al.*, 2000). Certains organes, dont les testicules, ne semblent pas présenter de variations journalières de l'expression des gènes horloges (Morse *et al.*, 2003 mais voir aussi Tong *et al.*, 2004). En plus des variations cycliques d'expression des gènes horloges, environ 10% de l'ensemble des gènes ont une activité qui semble être également soumise aux rythmes journaliers (Akhtar *et al.*, 2002 ; Panda *et al.*, 2002a ; Ptitsyn *et al.*, 2006). Par exemple, dans le foie murin, les enzymes intervenant dans la dégradation du cholestérol présentent un pic d'ARNm pendant le

jour et celles intervenant dans sa synthèse, un pic de nuit, en phase avec l'utilisation du cholestérol (Panda *et al.*, 2002a). Ces gènes interviennent donc dans de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme (dans le foie, implication de gènes intervenant dans la glycolyse, la biosynthèse du cholestérol et des acides aminés, la gluconéogénèse...), et le cycle cellulaire mais aussi dans des processus impliqués dans l'apparition de cancer (Fu *et al.*, 2002 et pour revue, Reddy *et al.*, 2005). Sur environ 500 gènes étudiés pour leur expression rythmique dans le cœur et le foie, seulement 52 sont communs aux deux tissus et 37 présentent la même phase d'expression (Storch *et al.*, 2002). Ces résultats, variables en fonction des études, peuvent s'expliquer par les différences dans la méthodologie utilisée pour sélectionner les gènes (amplitude minimale des oscillations, phase des pics...) (Duffield, 2003). Ainsi, **les oscillateurs périphériques ne sont pas à considérer dans leur ensemble car la nature des gènes exprimés rythmiquement et la phase de leur expression sont fonction du tissu** (voir [figure 24](#)). La transcription de certains gènes est soumise à l'action de l'horloge dans le foie mais pas dans les SCN ou inversement (Akhtar *et al.*, 2002). D'autres encore sont non rythmiques dans le foie en conditions normales mais leur transcription est augmentée ou diminuée chez les souris de la souche *Clock^{mut}* ce qui fait également d'eux, des gènes contrôlés par l'horloge, même s'ils ne présentent pas d'activité circadienne (Panda *et al.*, 2002a). Une autre preuve de cette différence de sensibilité des organes périphériques aux SCN vient d'expériences de comparaison entre rats jeunes et âgés. Les deux groupes présentent une expression rythmique de *Per1* de niveaux comparables dans les SCN mais aussi dans le foie, les reins et la pinéale mais pas dans les poumons où l'expression de *Per1* est arythmique chez les sujets âgés. De plus, les décalages de phase entre les pics d'ARNm de *Per1* dans les SCN et dans les organes périphériques sont identiques chez les rats jeunes et âgés pour le foie et la cornée mais ceux-ci sont fortement perturbés dans les PVN, la pinéale et les reins (Asai *et al.*, 2001 ; Yamazaki *et al.*, 2002). Ces résultats démontrent que, au moins face à l'âge, le couplage et/ou la synchronisation des cellules d'un même organe varie (poumon) et que le couplage des organes entre-eux est également affecté prouvant ainsi que les organes périphériques ne peuvent être considérés comme équivalents.

Les variations d'expression des gènes horloges dans les SCN étant synchronisées à 24h précises par le cycle LD, plusieurs études effectuées notamment sur des cultures de fibroblastes de rat, ont tenté de montrer quels sont les facteurs synchronisant des boucles moléculaires en périphérie. **L'application d'un glucocorticoïde de synthèse, le dexaméthasone, a pour effet d'induire l'expression de *Per1* mais pas celle de *Per2***

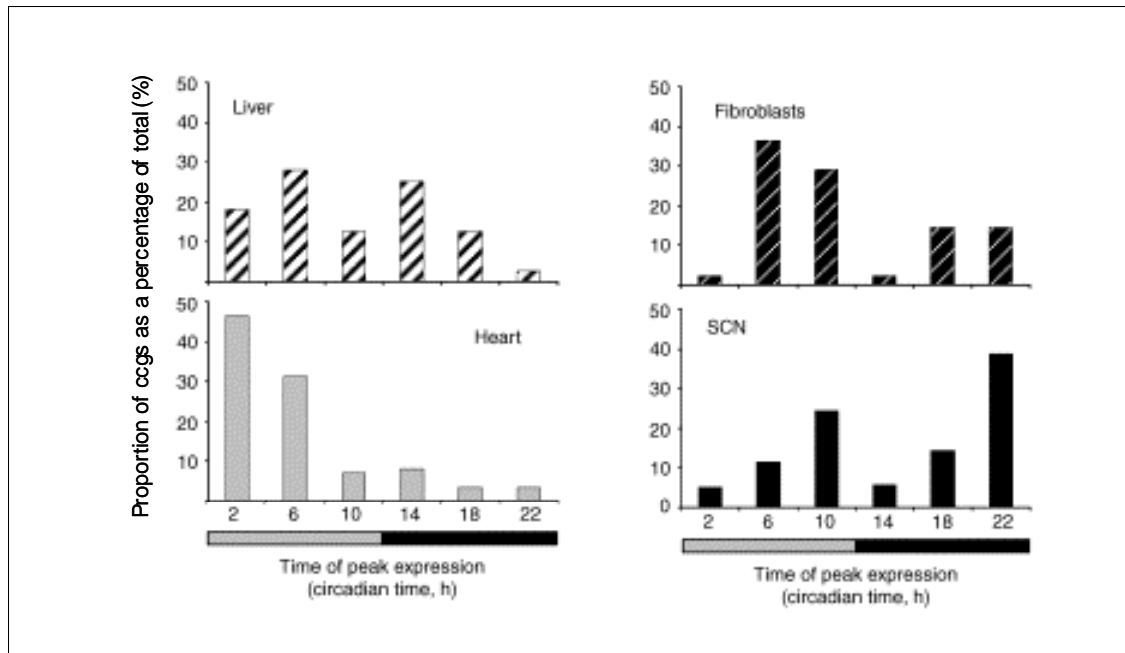


Figure 24 : Représentation des phases d'expression des gènes contrôlés par l'horloge dans différents organes périphériques (d'après Duffield, 2003).

Histogrammes des phases d'expression des gènes contrôlés par l'horloge (ccgs sur le graphique) sur 24 heures et en pourcentage des ccgs dans le foie, le cœur, les SCN de la souris et les fibroblastes de Rat-1. Les périodes circadiennes de jour et de nuit sont indiquées par des barres grises et noires, respectivement.

(Balsalobre *et al.*, 2000). De plus, cette induction étant observable quelque soit l'heure de l'application, il semble que les fibroblastes sont sensibles tout au long des 24h aux glucocorticoïdes, en terme d'expression de *Per1*. Concernant *Rev-erba* et *Dbp*, dont l'expression n'est pas directement induite dans les fibroblastes de rat par le dexaméthasone, une PRC a pu être établie (Balsalobre *et al.*, 2000 et voir [figure 25](#)). Celle-ci est différente de celle de l'activité locomotrice suite à l'application de créneaux lumineux chez cette espèce (voir [paragraphe A.1.4.1.](#)) car ici, il y a toujours apparition soit d'un retard soit d'une avance de phase. Il est à noter que les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur l'expression de *Rev-erba* chez l'homme, dans le foie (Torra *et al.*, 2000) contrairement donc aux fibroblastes de rat où il n'y a pas d'effet direct. Afin de prouver que cet effet des glucocorticoïdes sur l'expression de *Per1* est direct, Balsalobre et coll. (2000) ont étudié les effets de l'injection de glucocorticoïdes chez les souris *GR^{AlfrCre}* présentant une inhibition spécifique aux hépatocytes, du gène codant le récepteur des glucocorticoïdes (Kellendonk *et al.*, 2000). Suite à cette injection, l'activation de *Per1* est toujours présente dans le cœur, les reins mais abolie dans le foie des souris mutantes. Les glucocorticoïdes forment donc une voie d'entrée de régulation des boucles moléculaires des oscillateurs périphériques. Mais étant donné que chez les souris *GR^{AlfrCre}* les oscillations de l'expression des gènes horloges persistent dans le foie (Balsalobre *et al.*, 2000) ils ne semblent pas être nécessaires aux oscillations. **Ainsi, à l'inverse des SCN, la phase d'expression des oscillateurs périphériques pourrait être modifiée tout au long des 24h.**

En cultures de fibroblastes, l'application de glucose, un choc au sérum ou encore le renouvellement de milieu de culture permet également d'induire l'expression des gènes horloges (Balsalobre *et al.*, 1998 ; Grundschober *et al.*, 2001 ; Duffield *et al.*, 2002 ; Hirota *et al.*, 2002). **Un choc au sérum permet une induction rapide et transitoire de *Per1*** et la cinétique est identique à celle obtenue à la suite de l'application de forskoline (Yagita & Okamura, 2000). Comme la phosphorylation de CREB est également augmentée rapidement par ces deux traitements, il est probable que l'augmentation des ARNm de *Per1* soit due à P-CREB. En revanche, pour *Per2* dont l'expression est induite transitoirement par un choc au sérum, l'application de forskoline est sans effet, ce qui montre que d'autres mécanismes doivent entrer en jeu.

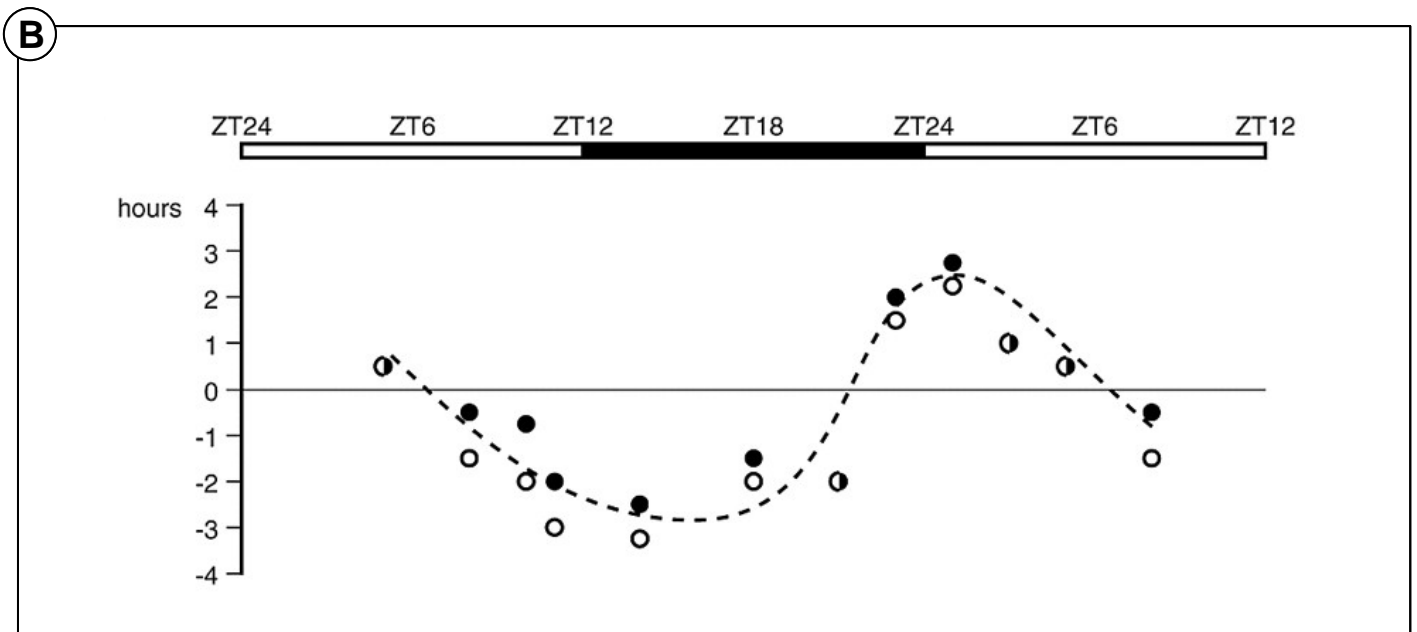
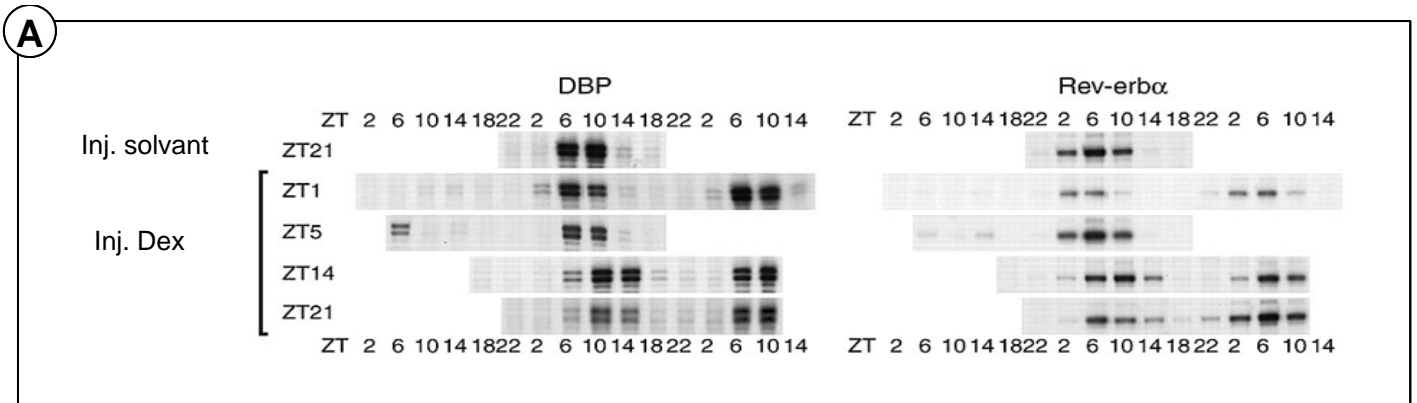


Figure 25 : Le dexaméthasone induit des décalages de phase des pics d'expression des gènes *Rev-erbα* et *Dbp*.

A. Les niveaux d'ARNm sont mesurés par Northern blot après injections (inj.) de solvant ou de dexaméthasone (dex) à ZT1,5,14 et 21. **B.** Courbe de réponse de phase obtenue par injection de dexaméthasone. Avances et retards de phase (en heures) d'apparition des pics des ARNm de *Dbp* (cercles blancs) et de *Rev-erbα* (cercles noirs) en fonction de l'heure d'injection de dexaméthasone (indiquée en ZT sur les barres blanches et noires représentant les périodes de jour et de nuit, respectivement).

Un renouvellement du milieu de culture permet d'induire une inhibition rapide et transitoire des niveaux d'ARNm de *Per1*, *Per2*, *Bmal1* et de *Dbp*. Parmi les différents composants du milieu de culture, il apparaît que seul le glucose ou ses dérivés semblent produire cette diminution. De plus, cet effet du glucose n'est pas direct car l'application de cycloheximide (CHX) l'inhibe. Afin de caractériser le facteur médiant l'effet du glucose, Hirota et coll. (2002) ont recherché par *microarray* quels sont les gènes dont l'expression est directement augmentée par l'application de glucose, même en présence de CHX. Ils ont isolé deux candidats potentiels, le *Tiegl* ("Transforming growth factor β -inducible early gene 1"), un répresseur transcriptionnel et le *Vdup1* ("Vitamin D3 up-regulated protein"), un régulateur de la transcription. TIEG1 permet d'inhiber la transcription en se fixant sur le motif SP1 (Cook & Urrutia, 2000). Comme *Per1* et *Bmal1* présentent un tel motif dans leur promoteur (Hida *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2002), il est possible que leur inhibition soit due au moins en partie à TIEG1. La transcription des gènes horloges par CLOCK/BMAL1 est soumise à l'influence du complexe CBP/p300 (voir [paragraphe A.1.3.2.1.](#)) dont l'activité est en partie régulée par la thioredoxine (Ema *et al.*, 1999). Or, VDUP1 peut inhiber la thioredoxine (Nishiyama *et al.*, 2001) ce qui permettrait une diminution de la transcription des gènes sous contrôle de CLOCK/BMAL1, dont *Per1*, *Per2* et *Dbp*.

Ainsi, les boucles moléculaires ont plusieurs voies d'entrée : au niveau des SCN, la voie principale est l'indication d'éclairement du monde extérieur via la rétine et au niveau des horloges périphériques, une interaction entre substances circulantes (glucocorticoïdes, glucose...) et le système nerveux forme la voie de synchronisation de ces horloges. Cependant, même au niveau cellulaire, certains facteurs semblent intervenir dans les mécanismes moléculaires de l'horloge. (1) L'état d'oxydoréduction du NAD ("Nicotinamide adenine dinucléotide") influe sur la capacité des dimères CLOCK/BMAL1 à se fixer sur les promoteurs. L'état réduit (NADH) active cette fixation tandis que l'état oxydé l'inhibe (Rutter *et al.*, 2001). (2) Une diminution de l'oxygénation induit l'activation du facteur HIF-1 ("Hypoxia-inducible factor-1") qui intervient dans la régulation de l'homéostasie de l'oxygène (pour revue, Wenger & Gassmann, 1997). Or, une hypoxie induit une augmentation des niveaux protéiques de PER1 et de CLOCK (Chilov *et al.*, 2001). Comme HIF-1 peut se dimériser avec PER1 (Chilov *et al.*, 2001) et avec BMAL1 (Hogenesch *et al.*, 1998), l'horloge interviendrait également dans la régulation des effets dûs à HIF-1. *In vitro*, HIF-1/BMAL1 peut activer la transcription, en se fixant sur la séquence promotrice 5'-TACGTGA-3'. La transcription de *Rora* est quant à elle augmentée par HIF-1 (Chauvet *et al.*, 2004 ; Miki *et al.*, 2004). Il est ainsi probable que celle de *Bmal1* le soit également, en réponse à l'augmentation

supposée de ROR α . Ainsi, bien que ces précédents exemples manquent encore de confirmation, il semble très probable que les boucles moléculaires des gènes horloges interviennent dans de nombreux (l'ensemble ?) des processus cellulaires et qu'elles soient elles-mêmes sensibles à toutes modifications afin de pouvoir réagir rapidement pour réguler l'homéostasie cellulaire. Ainsi, le rôle des boucles moléculaires ne serait pas uniquement de contrôler l'activité cellulaire mais aussi de réagir rapidement à tout type de stress, cellulaire comme physiologique pour réguler finement l'homéostasie des cellules, d'un organe et donc de l'organisme.

1.5.2. Un chef d'orchestre ?

Dans les premières études de la présence d'expression rythmique des gènes horloges en périphérie, en particulier dans les cultures de fibroblastes, ces oscillations s'amortissent en quelques jours (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Akhtar *et al.*, 2002 ; Izumo *et al.*, 2003) alors que pour les cultures de SCN, les oscillations persistent durablement (Kuhlman *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2000a ; Wilsbacher *et al.*, 2002). On peut alors supposer qu'en périphérie, les boucles moléculaires forment un "**oscillateur moléculaire**" entraînable par différents facteurs mais ne pouvant pas s'auto-entretenir à long terme contrairement à une "**horloge moléculaire**". Cette hypothèse est confirmée par l'abolition (apparente) des rythmes d'expression des gènes horloges en périphérie, à la suite de la lésion des SCN (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Akhtar *et al.*, 2002). Cependant, des études plus récentes (Yoo *et al.*, 2004 ; Welsh *et al.*, 2004 ; Hastings, 2005) ont montré que même en périphérie, la rythmicité persiste. Une explication de la divergence de résultats réside dans la méthode utilisée. Plusieurs études sont effectuées chez des souris transgéniques avec le promoteur de *Per1* couplé à un gène rapporteur. Or, la taille de la fraction du promoteur utilisé, pourrait en partie expliquer les amortissements dans la mesure où la partie responsable de la rythmicité n'est pas présente en totalité. Par comparaison, des résultats également divergents ont été rapportés pour les SCN, suivant que les auteurs ont utilisé une fraction du promoteur de *Per1* de 3kb (Quintero *et al.*, 2003) ou de 7.2kb (Yamaguchi *et al.*, 2003). Une seconde hypothèse a été récemment formulée pour expliquer l'amortissement du rythme d'expression des gènes horloges dans les organes périphériques isolés : les cellules de ces organes conservent une activité rythmique mais, contrairement à celles des SCN, se désynchronisent entre elles. Ainsi, l'application de sérum sur des cultures de fibroblastes, par exemple, permettrait soit d'induire la rythmicité

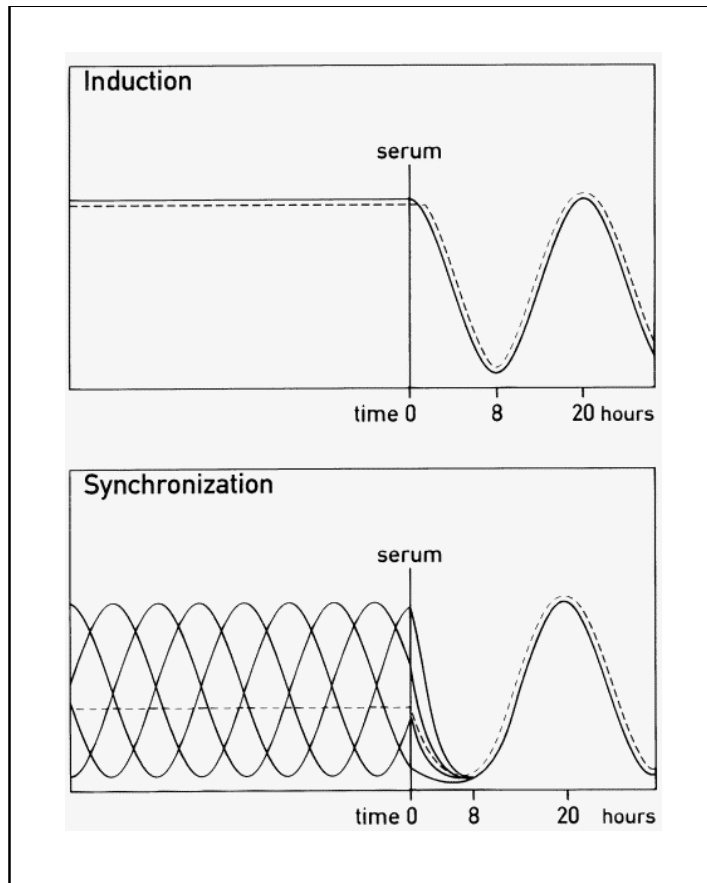


Figure 26 : Modèles hypothétiques de l'expression circadienne des gènes après un choc au sérum (d'après Balsalobre et al., 1998).

Les mécanismes proposés montrent, en réponse à l'application de sérum, soit une induction de la rythmicité (en haut, modèle induction), soit une synchronisation des rythmes préexistants (en bas, modèle synchronisation). Une cellule est représentée par les lignes noires et le tissu entier par la ligne pointillée.

(présence d'un oscillateur moléculaire) soit de (re-)synchroniser les cellules entre elles (présence d'horloges moléculaires). Ces deux modèles sont représentés [figure 26](#). Des enregistrements d'une résolution cellulaire ont permis de mettre en évidence que même dans les cellules des organes périphériques l'expression des gènes horloges est rythmique de manière endogène mais que ces cellules se désynchronisent en culture et sont resynchronisées par différents facteurs (Nagoshi *et al.*, 2004 ; Yoo *et al.*, 2004 ; Welsh *et al.*, 2004 ; Hastings, 2005). On peut en déduire que les cellules d'un organe périphérique sont synchronisées *in vivo* par les SCN, via les variations rythmiques de taux circulants de glucose (Yamamoto *et al.*, 1987 ; Cailotto *et al.*, 2005), de glucocorticoïdes et peut-être aussi par d'autres facteurs. *In vitro*, plusieurs autres facteurs ont été décrits, notamment un produit de la dégradation de la prostaglandine D2 (le 15d-PGJ2, "15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2") qui contrairement aux autres facteurs, n'agirait pas sur l'expression de *Per1* mais sur celles de *Cry1* et *Cry2* dans les fibroblastes de souris (Nakahata *et al.*, 2006). Cependant, les taux circulants de 15d-PGJ2 *in vivo* sont très faibles et leur présence rythmique reste à être démontrée. En parallèle, les taux de prostaglandine D2 sont rythmiques dans le fluide céphalorachidien chez le rat (Pandey *et al.*, 1995).

Ainsi, les cellules périphériques comme les cellules des SCN, portent le caractère rythmique de manière endogène. On peut se demander quel rôle reste-il aux SCN si ce n'est celui d'induire la rythmicité à l'ensemble de l'organisme ? Chez les animaux aux SCN lésés, les pics d'ARNm entre les cellules d'un même organe ([figure 27, en bas](#)) n'interviennent plus au même moment et ne sont donc plus en phase, et les relations de phase entre les différents organes ([figure 27, en haut](#)) sont modifiées. Le rôle des SCN serait donc de synchroniser (1) les cellules d'un même organe et (2) les différents organes entre eux afin que toute la physiologie tissulaire et de l'organisme entier soit en phase non seulement en fonction des besoins mais aussi avec le monde extérieur.

En comparaison de la définition d'horloge donnée au [paragraphe A.1.1.](#), les SCN formeraient ainsi l'horloge principale de l'organisme : synchronisable directement par le monde extérieur, génératrice de façon auto-entretenu d'une rythmicité tissulaire et conductrice de ces informations à l'ensemble de l'organisme. Chaque organe périphérique formerait quant à lui une horloge secondaire : synchronisable par voie nerveuse et/ou différents facteurs circulants, sous le contrôle de l'horloge principale, génératrice de façon auto-entretenu d'une rythmicité cellulaire et conductrice de ces informations aux fonctions propres de chaque organe

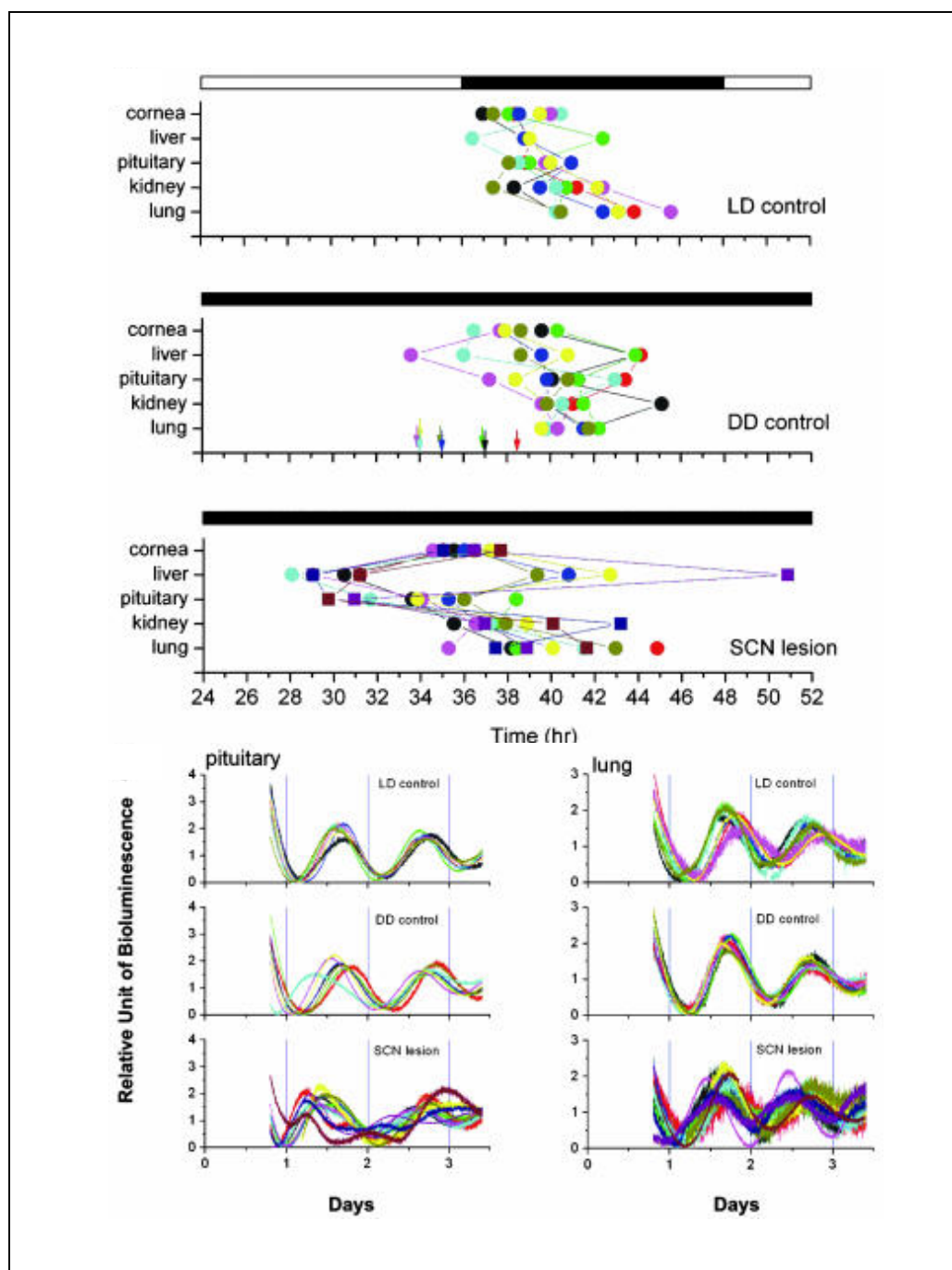


Figure 27 : Relations de phase mesurées par la bioluminescence de *PER2::LUC* entre différents tissus et entre différentes cellules d'un même tissu (d'après Yoo et al., 2004).

En haut : Représentation de la phase des rythmes de *PER2::LUC* de différents tissus de souris placées en LD, en DD ou ayant subi une lésion des SCN. Chaque animal est représenté par une couleur spécifique, et les valeurs des différents tissus d'un même animal sont connectées entre elles. Pour le groupe avec les SCN lésés, les cercles représentent 12 et 16 jours en DD et les carrés, 32 jours en DD. **En bas** : Représentation de la bioluminescence mesurée dans la tige pituitaire et les poumons de souris placées en LD, en DD ou après lésion des SCN. Chaque couleur représente les valeurs obtenues pour un animal.

périphérique. Ainsi, les organes périphériques présentent des **horloges moléculaires**, mais seuls les SCN forment une **horloge tissulaire** et jouent donc un rôle de "chef d'orchestre".

1.5.3. Exemple d'une relation horloge moléculaire-fonction.

Les gènes horloges exprimés dans la majorité des tissus, auraient donc pour rôle de contrôler la/les fonction(s) du tissu, de l'organe. Au niveau de l'horloge principale, ils permettent de coordonner les horloges périphériques afin que celles-ci présentent des fonctionnements avec des relations de phases stables entre elles. Leur rôle au niveau des horloges périphériques n'est pas encore bien connu et, de plus, paraît être tissu spécifique. En effet, non seulement le contrôle moléculaire de l'expression des gènes horloges est différent entre l'horloge principale que sont les SCN, et l'une des horloges périphériques qu'est le foie, mais ce contrôle semble également différer entre deux horloges périphériques (voir paragraphes A.1.2.7. et A.1.5.1.). Ainsi, la caractérisation de l'action des gènes horloges en périphérie ne peut se faire qu'au cas par cas, en ne considérant qu'un organe à la fois. Comme le foie est l'organe le plus étudié en terme de fonctionnement circadien, nous présenterons ici l'implication des gènes horloges dans le contrôle de l'une des étapes du métabolisme des lipides.

1.5.3.1. Peroxisome Proliferator-activated Receptor α .

Dans le contrôle du métabolisme des lipides, PPAR α ("Peroxisome proliferator-activated receptor α ") intervient dans la régulation des quantités de lipides circulants. Son mode d'action et le contrôle de sa transcription sont présentés ici.

PPAR α dimérisé avec RXR α ("Retinoid X receptor α ") active la transcription de ses gènes cibles en se fixant sur leur promoteur via les séquences PPREs ("Peroxisome proliferator-activated receptor response element"). Les PPREs sont composées d'une séquence hexamérique formée de 5'-(A/G)G(G/T)NCA-3' avec N, un nucléotide, précédée d'une région riche en A/T et répétée par une seconde séquence identique à un (A/T DR1, "Direct Repeat") ou à deux (A/T DR2) nucléotides (voir [figure 28A](#), Harding & Lazar, 1995 ; Hsu *et al.*, 1998). Physiologiquement, la transcription de *Ppara* peut être augmentée par des taux d'acides gras circulants élevés et en retour, les dimères PPAR α /RXR α contrôlent leurs cibles, dont les gènes *ApoAI* ("Apolipoprotéine AI") et *ApoCIII*, pour diminuer les concentrations en lipides sériques (Steineger *et al.*, 1994, et pour revue, Wahli *et al.*, 1995).

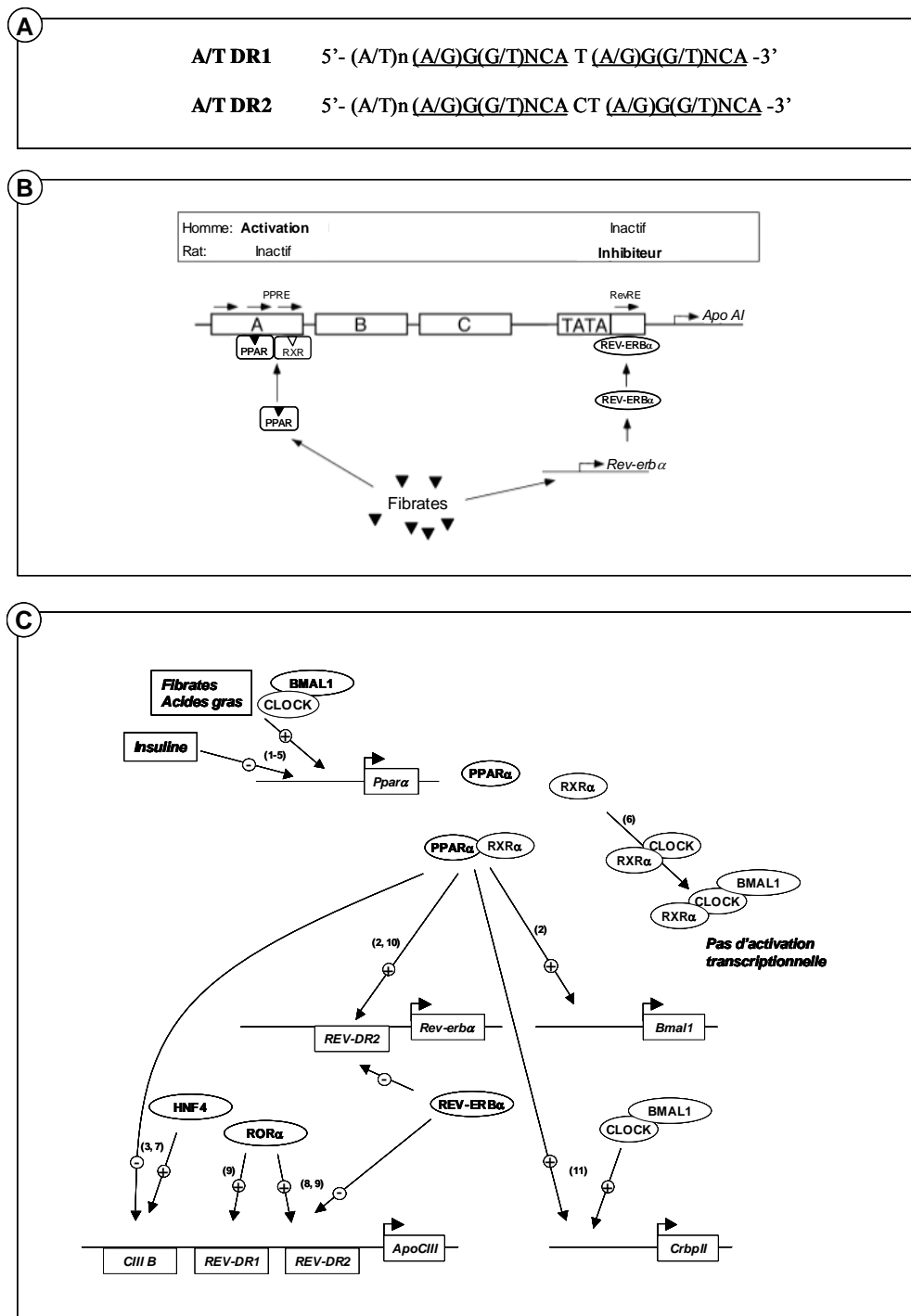


Figure 28 : Représentation schématique du mode d'action et des régulations de PPAR α .

A. Représentation des séquences reconnues par PPAR α . Les parties soulignées correspondent aux séquences répétées DR, n, nombre de bases. **B.** Contrôle de la transcription du gène ApoA1 par PPAR α et REV-ERB α chez l'homme et le rat, d'après Vu-Dac *et al.*, 1998. **C.** Synthèse bibliographique des voies de contrôles de la transcription de *Ppara* et des gènes contrôlés par PPAR α . CIII B, "apoCIII Binding element".

(1) Oishi *et al.*, 2005 ; (2) Canaple *et al.*, 2006 ; (3) Steineger *et al.*, 1994 ; (4) Lemberger *et al.*, 1994, 1996 ; (5) Bocher *et al.*, 2002 ; (6) McNamara *et al.*, 2001 ; (7) Wahli *et al.*, 1995 ; Hertz *et al.*, 1995 ; (8) Forman *et al.*, 1994 ; (9) Coste & Rodriguez, 2002 ; Raspé *et al.*, 2001 ; (10) Gervois *et al.*, 1999 ; (11) Inoue *et al.*, 2005.

L'application de diverses drogues sur des cultures cellulaires d'adipocytes est utilisée dans le but de mettre en évidence le rôle du complexe PPAR α /RXR α sur ses cibles. Les drogues de la famille des fibrates permettent une activation de la transcription de *Ppara* (Bocher *et al.*, 2002) et une diminution de celle des gènes *ApoAI* et *ApoCIII* chez le rat et la souris (Hertz *et al.*, 1995 ; Vu-Dac *et al.*, 1998). Le complexe PPAR α /RXR α n'agirait pas via la séquence (A/T)DR1 présente sur le promoteur d'*ApoCIII* mais entrerait en compétition avec un facteur de transcription activateur, le HNF-4 (Hertz *et al.*, 1995 ; Vu-Dac *et al.*, 1998). Pour *ApoAI*, bien que les promoteurs du rat et de l'homme présentent tous les deux un site (A/T)DR2 et un site (A/T)DR1, l'effet de PPAR α /RXR α est opposé. Chez l'homme, il en résulte une activation de la transcription. Chez le rat, ces séquences sont naturellement mutées, le dimère PPAR α /RXR α ne peut donc s'y fixer et, de plus, ce dimère permet une inhibition indirecte de la transcription d'*ApoAI* (voir [figure 28B](#), Vu-Dac *et al.*, 1998). Les gènes *ApoAI* et *ApoCIII* intervenant dans la régulation de la quantité de lipides circulants (Desvergne & Wahli, 1999), il en résulte une diminution de la concentration de triglycérides sériques suite à l'activation du gène *Ppara* par les fibrates. Ces résultats sont confirmés *in vivo* chez le rat *Ppara*^{-/-} présentant des taux élevés d'ARNm de l'*ApoCIII* dans le foie ainsi qu'une hypertriglycéridémie (Patel *et al.*, 2001 ; Gibbons *et al.*, 2002) sans que cette mutation ait des effets sur une autre fonction régulée par l'horloge principale, l'activité locomotrice (Canaple *et al.*, 2006).

1.5.3.2. Gènes horloges et PPAR α .

Plusieurs preuves indirectes du contrôle du métabolisme des lipides par les gènes horloges se sont accumulées au cours de ces cinq dernières années. D'une part, chez l'homme, la présence d'une perturbation du métabolisme des lipides est accrue par un travail posté (Ghiasvand *et al.*, 2006). Or, les périodes d'éclairage sur 24h de ces travailleurs varient au fil des jours et nous avons vu précédemment qu'une avance ou un retard de phase de l'arrivée de la lumière demande aux gènes horloges plusieurs jours pour avoir une expression de nouveau en phase avec l'environnement. Ainsi, des désordres du fonctionnement des SCN semblent incontournables et provoqueraient donc une dérégulation des signaux efférents provoquant à leur tour des désordres du fonctionnement des horloges périphériques. D'autre part, par *microarray*, plusieurs équipes ont mis en évidence le fait que dans le foie, de nombreux gènes présentent une expression rythmique laissant sous-entendre que tous ces gènes sont au moins en partie sous le contrôle direct/indirect des gènes horloges (Akhtar *et al.*, 2002 ; Panda *et al.*,

2002a ; Oishi *et al.*, 2003). Les gènes horloges semblent donc impliqués dans le contrôle du métabolisme des lipides.

Les souris *Clock^{mut}* présentent par exemple une hyperlipidémie et ne présentent plus, comme celles de la souche *Bmal1^{-/-}*, de variations cycliques des triglycérides circulants (Rudic *et al.*, 2004 ; Turek *et al.*, 2005). De plus, de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme des lipides, sont surexprimés ou à l'inverse sous-exprimés, dans le foie des souris *Clock^{mut}* par rapport aux souris de type sauvage (Panda *et al.*, 2002a ; Oishi *et al.*, 2003). CLOCK et BMAL1 permettent une augmentation de la transcription de *Ppara* (Oishi *et al.*, 2005 ; Canaple *et al.*, 2006) et il a été montré, dans des adipocytes, que BMAL1 permet de stimuler la synthèse des lipides (Shimba *et al.*, 2005). REV-ERB α peut inhiber la transcription d'*ApoCIII* en entrant en compétition avec ROR α qui l'active, via la séquence RORE (Forman *et al.*, 1994 ; Raspe *et al.*, 2001 ; Coste & Rodriguez, 2002). ROR α , contrairement à REV-ERB α , peut également agir sur la séquence (A/T)DR1 de ce même promoteur (Coste & Rodriguez, 2002). Ces résultats sont confirmés par des taux d'ARNm d'*ApoCIII* et de triglycérides circulants faibles chez les souris *straggerer* (présentant une mutation naturelle inactivant ROR α) et à l'inverse, des taux anormalement élevés d'ARNm d'*ApoCIII* après surexpression de ROR α dans des cultures d'hépatocytes (Raspe *et al.*, 2001). Le promoteur d'*ApoAI* présente également une séquence RORE ce qui permet d'expliquer l'effet inhibiteur chez le rat des fibrates sur la transcription d'*ApoAI*, cette séquence étant présente mais inactive chez l'homme (Vu-Dac *et al.*, 1998). L'inactivation de *Per1* en culture d'adipocytes induit une désorganisation du métabolisme des lipides (Marquez *et al.*, 2004). Ainsi, les gènes horloges permettraient de contrôler ou du moins de moduler le métabolisme des lipides via leur action sur *Ppara*, représenté [figure 28C](#). En retour, ce gène semble impliqué dans le contrôle des gènes horloges car chez les mutants *Ppara^{-/-}*, les expressions de *Bmal1* et de *Per3* ne sont pas modifiées dans les SCN mais sont affectées dans le foie en terme de diminution ou d'augmentation d'amplitude respectivement. Et, comme le promoteur de *Bmal1* présente une séquence (A/T)DR2 cela pourrait expliquer cette diminution d'amplitude observée (Canaple *et al.*, 2006). *Rev-erba* possède également une séquence (A/T)DR2 dans son promoteur ce qui permet son autoinhibition mais aussi son activation par ROR α (voir [chapitre A.1.3.2.](#)) et par PPAR α /RXR α (Gervois *et al.*, 1999). Cependant, bien que les protéines ROR α , PPAR α et REV-ERB α soient très similaires, permettant à chacune d'entre elles de se fixer sur des séquences PPREs, il n'y a pas de généralisation possible c'est à dire que les gènes possédant des PPREs ne sont pas tous sous le contrôle de ces trois protéines

(Hsu *et al.*, 1998 ; Kassam *et al.*, 1999). Enfin, RXR α , le partenaire de PPAR α , peut se dimériser avec CLOCK via leurs extrémités C-ter et indépendamment de la présence de BMAL1. Des trimères RXR α /CLOCK/BMAL1 peuvent se former, et il en résulte une diminution de la transactivation par CLOCK/BMAL1 via les E-Box (McNamara *et al.*, 2001). A l'inverse, les dimères PPAR α /RXR α et CLOCK/BMAL1 pourraient agir en synergie sur la séquence (A/T)DR2 de certains gènes et ainsi augmenter leur transcription, ce qui semble être le cas du gène *CrbpII* ("Cellular retinol binding protein II") (Inoue *et al.*, 2005).

Précédemment, nous avons vu que les horloges périphériques peuvent être synchronisées par des facteurs circulants, eux-mêmes régulés par les SCN. Le gène *Ppara* pourrait également être une voie d'entrée de la régulation des boucles moléculaires au sein du foie. D'une part, son expression est augmentée en cultures d'hépatocytes de rat par l'application de glucocorticoïdes mais elle est diminuée par la présence d'insuline (Lemberger *et al.*, 1994, 1996 ; Steineger *et al.*, 1994). L'application d'un stress par immobilisation provoquant un pic de glucocorticoïdes, permet également l'induction de la transcription de *Ppara* de façon tissu spécifique dans le foie, et la présence d'un inhibiteur des glucocorticoïdes bloque cette induction (Lemberger *et al.*, 1996). Ainsi, l'orchestration temporelle du métabolisme des lipides permettrait une optimisation de l'utilisation des nutriments absorbés entre voies d'utilisation ou de stockage des acides gras en fonction du cycle LD. En revanche, d'une part de nombreux autres facteurs sont également à prendre en compte comme par exemple la protéine RAR ("Retinoic acid receptor") pouvant se dimériser à la fois avec RXR et avec CLOCK et qui pourrait ainsi contrôler l'activité des ces deux protéines (McNamara *et al.*, 2001). La présence d'isoformes de PPAR α (Kliewer *et al.*, 1994) activables par d'autres substances (Bocher *et al.*, 2002) pourraient également prendre part au contrôle des gènes horloges dans le foie. Et, d'autre part, certains points seront à clarifier : si la transcription de *Rev-erb α* est sous le contrôle de PPAR α , son expression devrait être diminuée dans le foie des souris *Ppara*^{-/-}, ce qui ne semble pas être le cas (Canaple *et al.*, 2006).

2. Le système saisonnier.

2.1. INTERET DU SYSTEME SAISONNIER.

L'existence d'une physiologie saisonnière permet la survie de l'espèce dans un environnement variable. C'est ainsi qu'en hiver, il y a réduction à la fois de la disponibilité alimentaire et de la température environnante, l'animal doit donc être capable de s'adapter à ces importants changements de son environnement. Et pour cela, les adaptations de l'animal doivent anticiper les variations climatiques et biotiques. En effet, de nombreux animaux doivent faire leur stock de graisse avant l'hiver et les oiseaux migrateurs doivent effectuer leur voyage pendant que les conditions climatiques le leur permettent. Avec la même finalité, la naissance des petits doit se dérouler pendant la période de l'année la plus favorable, c'est à dire, dans la majorité des cas, au printemps. Pour se repérer dans le temps annuel, la plupart des animaux saisonniers utilisent les variations de la durée d'éclairement sur 24 heures ou la photopériode. Cependant, certaines espèces saisonnières ne sont pas influencées par les variations de la photopériode, c'est le cas du *Calomys laucha* (un rongeur sud américain vivant dans des terriers dans des dunes de sable où la température moyenne est de 5°C en hiver et de 29°C en été, avec une variation annuelle de la photopériode de 4h) dont les changements de couleur de pelage sont indépendants de la photopériode présente et du passé photopériodique (Camargo *et al.*, 2006) ou comme certains rongeurs subtropicaux vivants dans des biotopes dont le rythme de la saison des pluies (donc de la disponibilité alimentaire) est le synchroniseur annuel le plus important. Concernant les rythmes de reproduction chez les animaux sensibles à la photopériode, on distingue, en fonction de la durée du développement embryonnaire, les **animaux de jours longs** se reproduisant lorsque la durée du jour augmente et dont la durée de gestation est courte, et les **animaux de jours courts** se reproduisant lorsque la durée du jour diminue et dont la durée de développement embryonnaire est longue ; ce qui permet d'avoir dans tous les cas un maximum de naissances au printemps. Au sein de l'organisme, une hormone joue un rôle important pour le contrôle des physiologies saisonnières dont celle de la reproduction ou du pelage, il s'agit de la **mélatonine** libérée par la glande pinéale. En effet, la durée de sa libération qui est nocturne, varie au cours des saisons. C'est ainsi qu'une pinéalectomie chez le hamster syrien, inhibe l'apparition d'une physiologie de type hiver... L'une des cibles majeures de la mélatonine chez de nombreuses espèces est la *Pars tuberalis* de l'adénohypophyse qui intervient dans le

contrôle de la libération de prolactine par la *Pars distalis* permettant les adaptations annuelles de la qualité du pelage des animaux. Dans cette partie, nous verrons alors comment la photopériode permet ces adaptations saisonnières tant au niveau physiologique que moléculaire, et aussi le rôle particulier de la mélatonine pinéaliennne et celui de la *Pars tuberalis* dans le contrôle saisonnier de la libération de prolactine. Enfin, un dernier chapitre concernera la mise en évidence chez certaines espèces d'une "horloge saisonnière endogène".

2.2. ROLE DE LA PHOTOPERIODE.

2.2.1. La physiologie au cours des saisons.

Le cycle annuel de la reproduction a été mis en évidence chez des espèces de jours courts (mouton) et chez des espèces de jours longs (comme les hamsters sibérien, syrien et d'Europe). L'un des moyens de se rendre compte de l'évolution de la physiologie reproductive, est de suivre chez les mâles le décours temporel de la taille (ou de la masse) des gonades. Sur la [figure 29](#) (d'après Reiter, 1980), on remarque que chez le hamster syrien maintenu en conditions naturelles, la taille des testicules varie en fonction des saisons. De plus, l'activité sexuelle (la capacité à se reproduire) est fonction de cette taille. En fonction des saisons, le hamster syrien présente donc des périodes d'activité sexuelle, d'inhibition de l'activité sexuelle, de repos sexuel, et de restauration de cette activité. L'influence de la photopériode sur ces différents états physiologiques sera abordée dans cette partie.

2.2.1.1. Photopériode critique.

Dans le cas du hamster syrien, animal de "jours longs", les animaux sont sexuellement actifs en photopériode longue (LP). A partir d'un certain seuil, une diminution de la durée de photopériode aura comme effet de rendre les animaux sexuellement inactifs en quelques semaines. Ce seuil a permis de définir la "photopériode critique" en dessous de laquelle les hamsters syriens sont inactifs et au-dessus de laquelle ils sont sexuellement actifs. Dans le cas du hamster syrien, la photopériode critique est de 12h30 et elle est de 15h30 chez le hamster d'Europe (Elliott, 1976 ; Canguilhem, 1988b). Dans le cas du hamster sibérien, ce n'est pas tant la durée d'éclairement absolue qui est importante mais plutôt sa différence par rapport à la photopériode précédente (Duncan *et al.*, 1985 ; Hoffmann & Illnerova, 1986 ; Stetson *et al.*, 1989 ; Prendergast *et al.*, 2000, 2004). Placés en LD14:10 ces animaux pourront donc

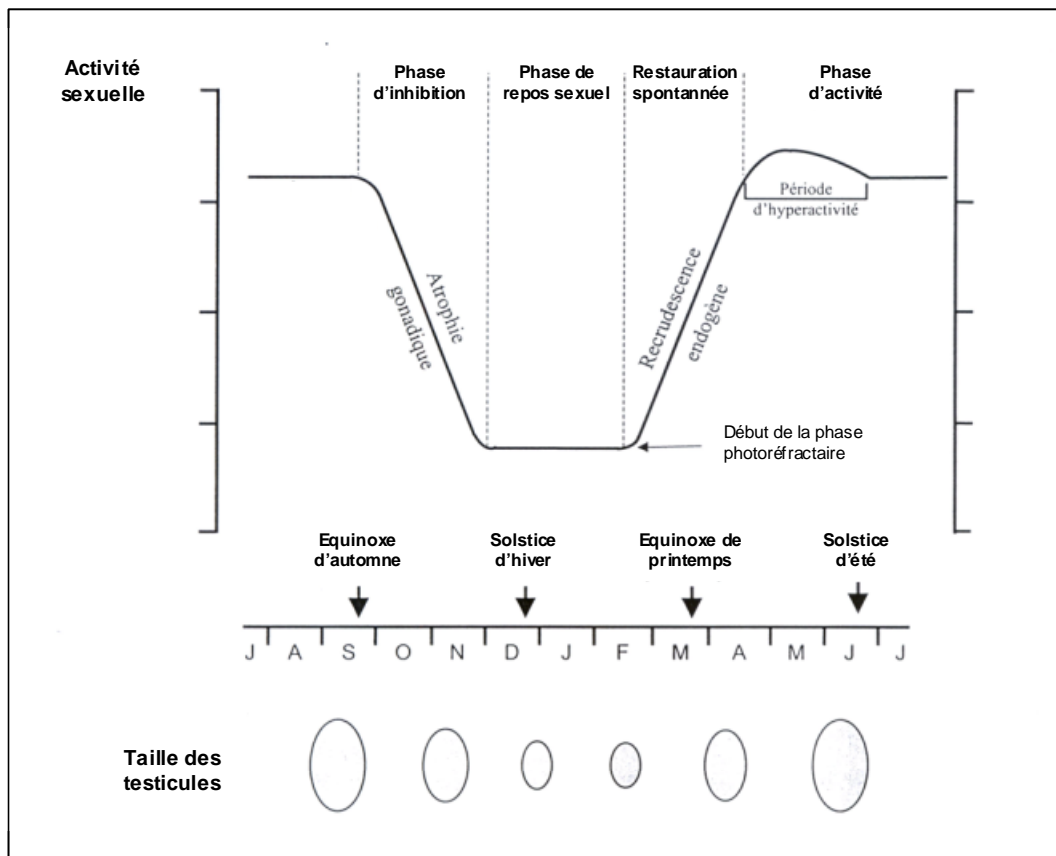


Figure 29 : Cycle annuel de la fonction de reproduction chez le hamster doré maintenu en condition naturelle (d'après Reiter, 1980).

L'activité sexuelle varie au cours des saisons et en fonction de la taille des testicules chez les hamsters syriens mâles. La diminution de photopériode en automne entraîne une diminution de la taille des testicules et ainsi de l'activité sexuelle. S'en suit en hiver une période de repos sexuel. Au printemps, les animaux présentent une recrudescence endogène de la taille des testicules permettant une restauration spontanée de l'activité sexuelle. Au printemps et en été, les animaux sont sexuellement actifs.

présenter une augmentation ou une réduction de leur activité sexuelle suivant que cette photopériode a été précédée d'une photopériode plus courte ou d'une plus longue. Lors de la gestation chez cette espèce, la photopériode est également importante. En effet, si les petits sont placés en LD14:10 dès leur naissance, le développement testiculaire s'effectuera plus rapidement si les mères avaient été placées en LD10:14 quand elles étaient gestantes que si elles avaient été placées LD16:8 (Shaw & Goldman, 1995). Le mouton, animal de "jours courts" présente également une sensibilité à la photopériode en terme d'activité sexuelle. Mais, dans ce cas, pour des photopériodes supérieures à sa photopériode critique, le mouton devient inactif sexuellement.

L'activité sexuelle n'est qu'un indicateur de la photopériode critique mais de nombreuses autres adaptations, physiologiques et comportementales, dépendent de cette photopériode. Par exemples, la qualité du pelage, l'hibernation, le nombre de lymphocytes chez le hamster sibérien (Prendergast *et al.*, 2004 ; Yellon *et al.*, 2005) et l'activité locomotrice chez le hamster syrien (Hastings *et al.*, 1987) sont également dépendants de la photopériode.

2.2.1.2. Photopériode réfractaire.

Les hamsters syriens maintenus en LP sont donc actifs sexuellement alors qu'en photopériode courte (SP), ils sont inactifs. En prolongeant la LP pendant plusieurs mois, les animaux restent toujours actifs tandis qu'en prolongeant la SP pendant plusieurs mois, les animaux redeviennent actifs sexuellement. Ainsi, même si la photopériode est toujours de type SP, la physiologie des animaux redevient de type LP. Les animaux sont donc insensibles à la photopériode ambiante, on parle de "période photoréfractaire". Et, pour que les animaux redeviennent sensibles à la SP, ils doivent obligatoirement être placés en LP pendant un certain temps. Dans le cas du hamster syrien, l'état physiologique photoréfractaire est obtenu après environ 23-25 semaines en SP (voir [figure 29](#)). Dans le cas du mouton, une exposition longue à la LP permet dans un premier temps une décroissance testiculaire mais, en prolongeant la LP pendant plusieurs mois, les animaux redeviennent actif sexuellement (pour revue, Lincoln *et al.*, 2003b). Le hamster syrien et le mouton présentent des états réfractaires et, afin de les distinguer, nous parlerons de photopériode courte réfractaire ("SP-R") dans le cas du hamster syrien et de photopériode longue réfractaire ("LP-R") dans le cas du mouton.

L'état réfractaire présente un intérêt physiologique important notamment en ce qui concerne la survie des espèces. Sur la [figure 29](#), on peut remarquer que cet état apparaît bien avant d'avoir une photopériode supérieure à la photopériode critique du hamster syrien. Cette

reprise spontanée de l'activité sexuelle permet aux animaux d'être actifs sexuellement dès le début de printemps, maximisant ainsi la durée de période de reproduction. Ceci permettant la naissance des petits à la période la plus favorable de l'année (fin de printemps/début d'été). Les mécanismes cellulaires et moléculaires associés à cet état particulier qu'est la période photoréfractaire, seront abordés dans un chapitre suivant (A.2.5.).

2.2.2. Des modèles pour expliquer la mesure du temps.

Les animaux arrivent donc en quelques sorte à mesurer le temps extérieur, à lire la photopériode... Deux principaux modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier, dit de "coïncidence externe", postule la présence d'une période de photosensibilité de l'organisme qui permettrait de déclencher les réponses physiologiques en fonction de la présence ou de l'absence d'éclairement pendant cette période. Le second, de "coïncidence interne", prévoit la présence de deux oscillateurs endogènes et les variations des relations de phase entre eux au cours des saisons, détermineraient les conséquences physiologiques. Une schématisation de ces deux modèles est donnée [figure 30](#) (d'après Boissin & Canguilhem, 1998).

2.2.2.1. Le modèle de coïncidence externe.

Ce modèle repose en partie, sur l'existence d'un rythme journalier de photosensibilité des animaux en terme d'état d'activité sexuelle. Nous avons vu par exemple qu'en LP les hamsters syriens sont actifs sexuellement et que leur exposition à une SP provoque une décroissance testiculaire. Dans ce modèle, ce n'est pas la durée de photopériode qui est importante en soi mais c'est le moment où la lumière est présente qui est déterminante. Ainsi, si la lumière est présente lorsque les animaux présentent leur période endogène de sensibilité à la lumière (en LD16:8 sur la [figure 30A](#)), la croissance testiculaire ne sera pas inhibée. Si la lumière n'est, en revanche, pas présente en même temps que s'exprime la période endogène de sensibilité à la lumière (en LD8:16 sur la [figure 30A](#)), les animaux présenteront une décroissance testiculaire.

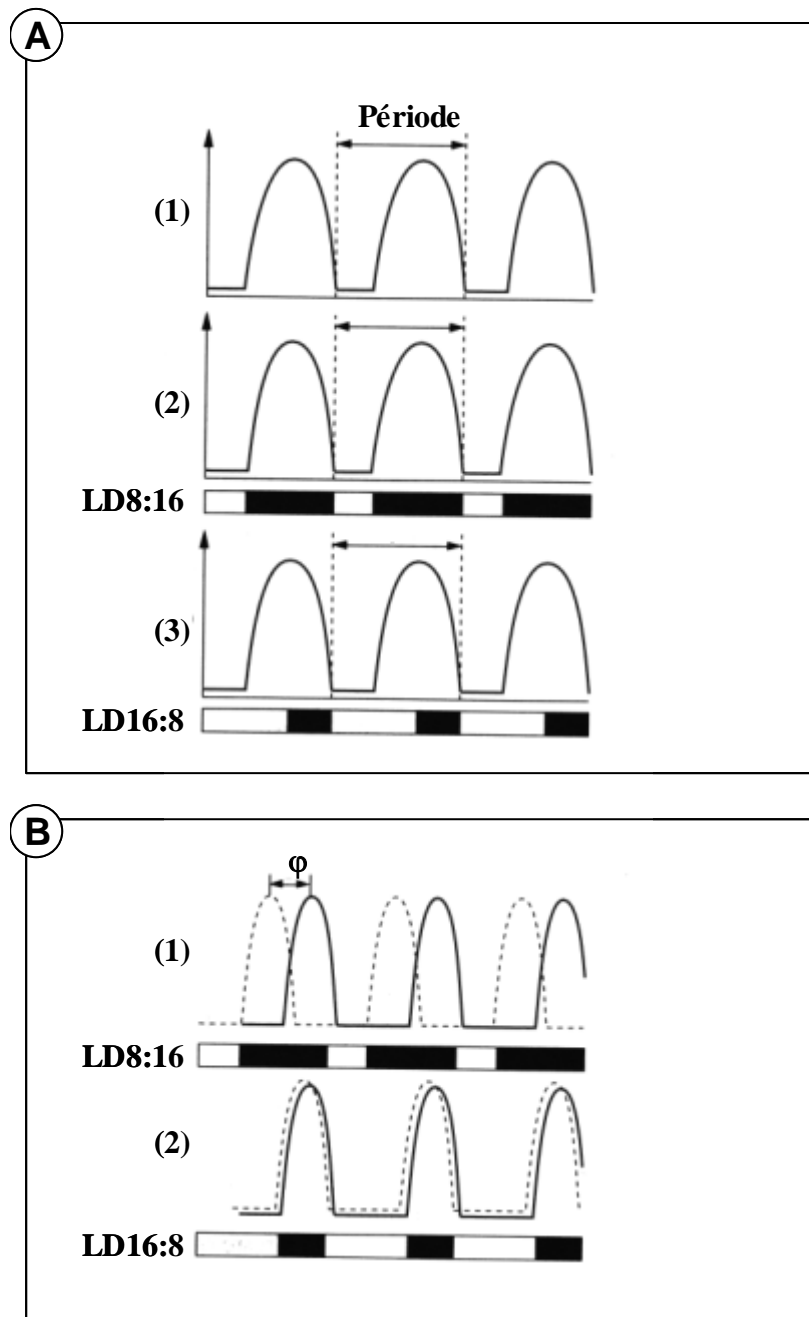


Figure 30 : Deux modèles hypothétiques pour expliquer la mesure du temps photopériodique (d'après Boissin & Canguilhem, 1998).

Deux modèles sont proposés pour expliquer la mesure du temps photopériodique, c'est à dire en fonction des durées d'éclairement sur 24 heures (représentées par des barres blanches et noires pour les périodes de lumière et d'obscurité, respectivement). **A.** Le modèle de coïncidence externe. (1) représentation du cycle circadien de la période de photosensibilité, cette période est différente de 24 heures ; (2) les cycles LD8:16 confèrent une période égale à 24 heures et la lumière n'atteint pas la phase de photosensibilité ; (3) les cycles LD16:8 confèrent une période égale à 24 heures et la lumière atteint la phase de photosensibilité. **B.** Le modèle de coïncidence interne. Les effets physiologiques sont produits lorsque deux rythmes circadiens présentent entre eux des relations de phase particulières. Le rythme représenté en pointillé est entraîné par le cycle LD (1) et, quand la durée de l'éclairement le permet, sa phase entre en coïncidence avec le cycle représenté en trait continu (2).

2.2.2.2. Le modèle de coïncidence interne.

Ce second modèle proposé par Pittendrigh (1960, 1972) suppose l'existence de deux oscillateurs circadiens, l'un du matin (M, "morning") et l'un du soir (E, "evening") (voir [figure 30B](#)). Ces oscillateurs seraient entraînés par la transition nuit/jour et jour/nuit, respectivement. De ce fait, ni la durée de la nuit ni la durée du jour ne sont déterminantes, mais ce sont les relations de phase entre les deux oscillateurs, variables au cours des saisons, qui permettent l'adaptation des animaux. Ce modèle a été établi notamment à partir de l'observation de dédoublement de l'activité locomotrice de hamsters syriens et de souris (phénomène de "splitting", voir [figure 31](#), Harrington et Rusak, 1986 ; Ohta *et al.*, 2005). Ces animaux placés en LL, ne présentent plus un rythme d'activité locomotrice unimodal mais ce rythme devient bimodal. Comme l'activité locomotrice est dirigée par les SCN, les oscillateurs M et E feraient partie des SCN. Les enregistrements de deux pics d'activité électrique aux transitions jour/nuit et nuit/jour sur des tranches horizontales de SCN (Jagota *et al.*, 2000 et [paragraphe A.1.2.3.](#)), confirment l'existence de deux oscillateurs ce qui est en faveur d'un tel modèle. Il apparaît qu'au cours du phénomène de "splitting", l'expression des gènes horloges s'effectue en anti-phase non seulement entre diverses sous-régions d'un SCN mais aussi globalement entre le SCN droit et le SCN gauche (de la Iglesia *et al.*, 2000 ; Ohta *et al.*, 2005 ; Yan *et al.*, 2005). Nous avons également vu précédemment ([paragraphe A.1.3.1.1.](#)) que les mutants *Per2^{-/-}Cry2^{-/-}* sont rythmiques (Oster *et al.*, 2002) alors que les simples mutants *Per2^{-/-}* sont arythmiques. A partir de ces données, Daan et coll. (2001) ont proposé un modèle dans lequel le dimère PER2/CRY2 représenterait l'un des deux oscillateurs. Chez les mutants *Per2^{-/-}* cet oscillateur serait fortement perturbé et conduirait ainsi à l'arythmie locomotrice. Et, chez les doubles mutants *Per2^{-/-}Cry2^{-/-}*, cet oscillateur serait totalement absent et cette absence serait sans conséquence sur le rythme d'activité locomotrice. Comme le pic d'expression de *Per1* se situe en début de jour (ZT2-4) et celui de *Per2* en fin de jour (ZT8-12), les auteurs ont proposé que l'oscillateur du matin serait dirigé par le dimère PER1/CRY1 et celui du soir par PER2/CRY2. Ainsi, les phases des pics de PER1/CRY1 et de PER2/CRY2 seraient rapprochées en hiver et éloignées en été, permettant ainsi une physiologie adaptée.

Nos résultats des études de l'effet de la photopériode sur les SCN seront discutés en fonction de ce modèle de coïncidence interne.

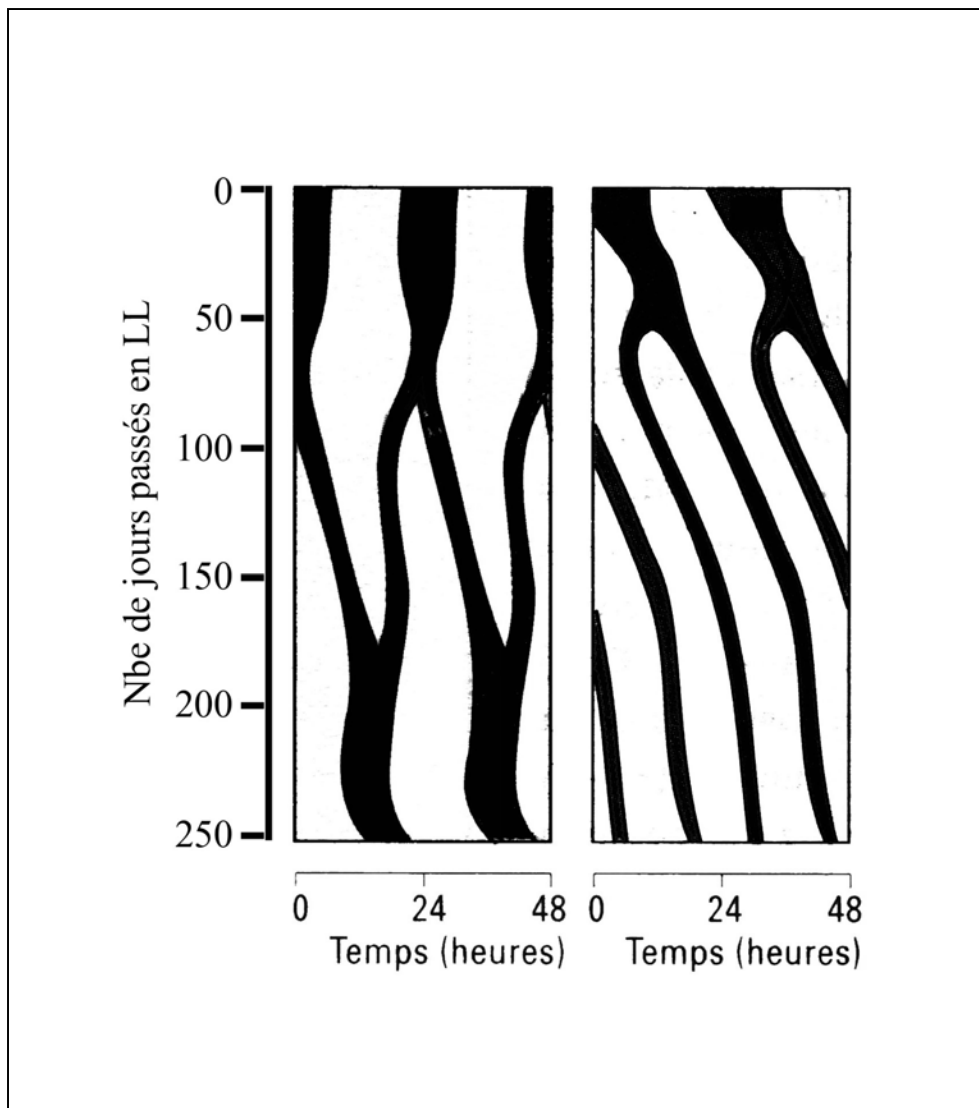


Figure 31 : Exemples d'actogrammes de deux hamsters syriens en cours de splitting.

Actogrammes en double-représentation de l'activité locomotrice de roue, chez deux hamsters syriens, en cours de splitting. Dans les deux cas, les animaux présentent en début d'expérience une activité rythmique unimodale. Au fil du temps passé en condition LL, ces animaux présentent deux moments d'activité par jour. Dans le cas présenté à gauche, les deux composantes de ces activités n'ont pas la même période et, dans le cas présenté à droite, ces deux composantes ont la même période.

2.2.3. L'horloge principale au cours de saisons.

L'existence d'une physiologie saisonnière chez de nombreuses espèces est connue et bien décrite. En revanche, les structures anatomiques et les mécanismes impliqués dans ces adaptations physiologiques sont restés mal connus, pendant longtemps. Depuis la mise en évidence de l'horloge principale, dans les SCN, plusieurs équipes de recherche ont tenté de déterminer si cette horloge circadienne pouvait également être impliquée dans les changements physiologiques saisonniers. Aussi, il a été mis en évidence chez le rat (Sumova *et al.*, 1995a), le hamster syrien et le hamster d'Europe (Vuillez *et al.*, 1996) que l'induction du *c-fos* est possible à la suite d'un créneau lumineux effectué de nuit (subjective ou non) et cette induction intervient quelque soit l'heure d'application du créneau pendant la période nocturne du nyctémère. De ce fait, la durée de photosensibilité des SCN est différente en fonction de la photopériode et directement proportionnelle à la durée de la nuit. De plus, chez le hamster syrien, à la suite d'un transfert d'une photopériode longue (LD14:10) à une photopériode courte (LD10:14), la durée de photosensibilité s'allonge et 25 jours sont nécessaires pour coder la nouvelle photopériode en terme d'induction du *c-fos* (Jacob *et al.*, 1997). Ces premiers résultats mettent en évidence que les SCN semblent avoir un fonctionnement dépendant de la photopériode. Avec l'apparition des gènes horloges, de nouvelles études ont permis de mettre en évidence que la durée des pics des ARNm des *Per1* (chez le hamster syrien, le hamster sibérien le mouton et la souris, Messager *et al.*, 1999, 2000 ; Lincoln *et al.*, 2002 ; Steinlechner *et al.*, 2002) et des protéines PER1 et PER2 (chez le hamster sibérien, Nusslein-Hildesheim *et al.*, 2000) varie en fonction de la photopériode. Quant à la CALB et aux deux principaux neuropeptides des SCN, il a été montré qu'ils présentent une diminution de leur expression en SP chez le rat (*Avp* : Jac *et al.*, 2000), le hamster sibérien (*Avp* et *Vip* : Duncan *et al.*, 1995 ; Duncan, 1998) et le hamster syrien (CALB : Menet *et al.*, 2003) mais que l'expression de la *Somatostatine* ne dépend pas de la photopériode (Duncan, 1998).

L'activité électrique globale des SCN est également dépendante de la photopériode. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'*in vitro*, la durée de la période d'activité électrique est identique entre les SCN prélevés chez des animaux maintenus dans deux photopériodes courtes (SP8:16 et SP12:12) mais elle est doublée si les animaux étaient en photopériode longue (LP16:8) (Mrugala *et al.*, 2000). Ainsi, chez le hamster syrien, il est possible que les

SCN présentent deux modes de réponses couplés aux photopériodes inférieures ou supérieures à la photopériode critique. De plus, non seulement les neurones des SCN présentent des décalages de phase des rythmes de décharge sur 24 heures (voir [paragraphe A.1.2.3.](#)) mais les relations de phase entre neurones sont affectées par la photopériode chez le rat (Schaap *et al.*, 2003). Au niveau des SCN entiers, il en résulte que le pic global de décharge est plus long avec une amplitude plus faible en LP qu'en SP. Ainsi, les communications entre cellules des SCN pourraient intervenir dans l'intégration d'une nouvelle photopériode par les SCN.

Il existe peu de données portant sur l'expression des gènes horloges en fonction des saisons, contrairement aux données sur le fonctionnement circadien (voir chapitre A.1.3.), nous avons donc caractérisé l'effet de la photopériode sur l'expression des gènes horloges dans les SCN, chez plusieurs espèces de rongeurs.

2.3. UNE HORMONE... DONNEUSE DE TEMPS.

La synthèse nocturne de mélatonine par la glande pinéale est sous le contrôle des SCN (voir [paragraphe A.1.2.7.1.](#)). Ainsi, la mélatonine, dont l'enzyme limitante pour sa synthèse est l'AA-NAT avec un contrôle transcriptionnel chez les rongeurs et post-traductionnel chez le mouton, permet de transmettre une information journalière à l'organisme. De plus, le pic de mélatonine présente des adaptations saisonnières en terme notamment de durée. Ces variations annuelles et proportionnelles à la durée de la nuit, permettent les adaptations physiologiques, comme la reproduction, chez les animaux photopériodiques. En effet, des hamsters (sibérien et syrien) maintenus en LP et pinéalectomisés, ne présentent pas la régression testiculaire normalement attendue après transfert des animaux en SP. Ici, nous nous intéresserons au contrôle photopériodique de la synthèse de mélatonine, à la caractérisation et à la localisation de ses récepteurs et aux effets circadiens et saisonniers qu'elle provoque.

2.3.1. Synthèse de la mélatonine et variations circadiennes & saisonnières.

La voie de synthèse de mélatonine est représentée sur la [figure 32](#). En terme journalier chez les rongeurs, seul le gène *Aa-nat* présente une activité transcriptionnelle dépendante du temps permettant le rythme de synthèse de mélatonine. Une fois synthétisée, cette dernière est directement libérée dans la circulation où sa demi-vie est courte (environ 20 min). Ce rythme de synthèse est endogène et persiste donc en conditions constantes du moment que l'intégrité des SCN est préservée (Klein & Moore, 1979) et, une exposition nocturne des animaux à la

lumière entraîne une inhibition de sa synthèse/libération. La libération de mélatonine a lieu non seulement dans la circulation sanguine mais aussi dans le fluide céphalorachidien où, chez le mouton, les plus fortes concentrations de mélatonine sont trouvées (Malpaux *et al.*, 2001).

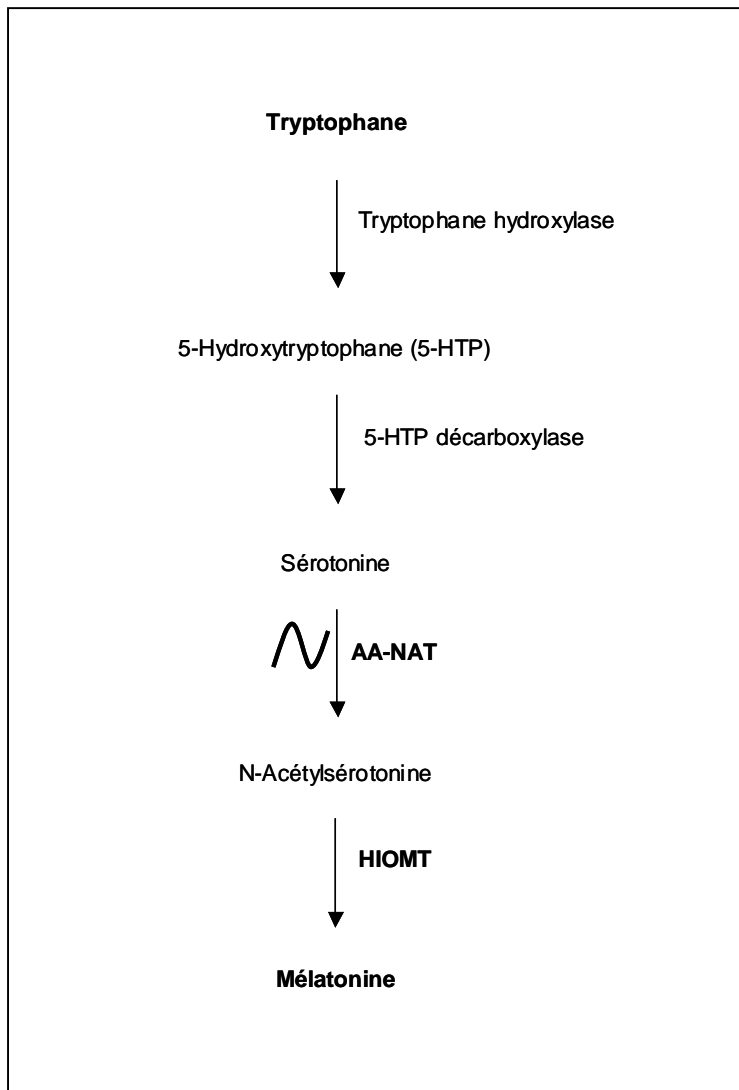


Figure 32 : Synthèse de la mélatonine.

La mélatonine est synthétisée à partir du tryptophane. Chez les rongeurs, l'enzyme limitante de cette synthèse est l'AA-NAT présentant un rythme circadien de ses transcrits. Une seconde enzyme, l'HIOMT, n'ayant pas d'activité rythmique sur 24 h peut être impliquée en fonction des espèces, dans le contrôle saisonnier de la synthèse de mélatonine. AA-NAT : Aryl-acrylamine N-acétyl transférase; HIOMT : Hydroxy-indole-O-méthyl-transférase.

Au cours des saisons, la durée de la nuit varie, elle est associée à une variation similaire de la durée du pic de mélatonine, et de son amplitude chez certaines espèces. Le contrôle saisonnier de la synthèse de mélatonine s'effectue par un contrôle direct de la durée d'expression de l'*Aa-nat* pour ce qui est de la durée du pic de mélatonine, et de l'activité de l'HIOMT ("Hydroxy-indole-O-méthyl-transferase") pour ce qui est de son amplitude (Ribelayga *et al.*, 1999, et pour revue, Simonneaux & Ribelayga, 2003).

2.3.2. La mélatonine et ses récepteurs.

2.3.2.1. Cibles de la mélatonine.

Avant même d'avoir réussi à caractériser la nature des récepteurs de la mélatonine, de nombreuses équipes ont cherché à mettre en évidence leur présence. Dans ces études, les auteurs ont réalisé des autoradiographies avec de la mélatonine marquée à l'iode 125 ou de la 2-iodo-mélatonine (Vakkuri *et al.*, 1984) ce qui permettait ensuite, par autoradiographie de mettre en évidence les sites de fixation de la mélatonine (pour revues, Masson-Pévet *et al.*, 1994b ; Morgan *et al.*, 1994). Par ces méthodes, plus d'une centaine de structures cérébrales a pu être détectée chez les mammifères mais avec une importante variabilité pour la localisation et le nombre de structures marquées entre espèces, pour la densité du marquage entre différentes structures chez une même espèce et entre différentes espèces pour une même structure. Au total, seuls les SCN et la *Pars tuberalis* apparaissent marqués de façon conservée entre les différentes espèces étudiées... Quelle est l'origine de cette grande variabilité de marquage ? Outre le fait des différences de protocoles, une hypothèse est que la fonction même de la mélatonine est responsable de cette variabilité (Pévet, 2003). En effet, comme nous le verrons plus tard, les fonctions photopériodiques dépendent de la mélatonine : la reproduction, la masse corporelle, l'hibernation, la torpeur journalière, la couleur et la qualité du poil... Mais, aucune ou alors très peu d'espèces ne présentent toutes ces adaptations. La répartition des tissus sensibles à la mélatonine pourrait donc être corrélée aux types de fonctions contrôlées. De plus, le mode de contrôle peut être différent pour une même fonction entre deux espèces et pour différentes fonctions chez une même espèce. Par exemple, une augmentation de la durée du pic de mélatonine inhibe l'activité sexuelle chez le hamster syrien alors qu'elle l'active chez le mouton (Tamarkin *et al.*, 1977 ; Lincoln & Ebling, 1985). Et, l'injection d'antagonistes de la mélatonine à des hamsters syriens placés en SP et à faible

température, diminue la durée d'hibernation mais n'affecte pas l'atrophie gonadique (Pitrosky *et al.*, 2003).

2.3.2.2. Les récepteurs MT1 et MT2.

Depuis lors, plusieurs récepteurs ont pu être clonés et caractérisés dont les récepteurs membranaires de haute affinité MT1 et MT2 (Reppert *et al.*, 1994 ; 1995). Les récepteurs MT1 et MT2 sont des récepteurs couplés à une protéine G de type inhibitrice sensible à la toxine pertussique (Reppert *et al.*, 1994 ; Starkey *et al.*, 1995 ; Liu *et al.*, 1997a ; van den Top *et al.*, 2001). La stimulation du MT1 permet de diminuer la quantité d'AMPc produite par l'adénylate cyclase suite à une stimulation à la forskoline mais n'a pas d'effet sur le niveau basal d'AMPc tandis qu'une stimulation du MT2 provoque une diminution des taux de GMPc (Reppert *et al.*, 1994 ; Vanecek & Watanabe, 1998, Petit *et al.*, 1999 ; Morgan, 2000). La présence de ces récepteurs, au moins pour le MT1, dépend non seulement du moment circadien mais aussi de la photopériode. Ainsi, dans les SCN, la présence des ARNm de *Mt1* est circadienne (Poirel *et al.*, 2002 mais voir aussi Sugden *et al.*, 1999) tout comme la densité de la liaison de la mélatonine (Gauer *et al.*, 1993a), avec des valeurs maximales obtenues en fin de jour. Et, dans la PT, les niveaux d'ARNm de *Mt1* sont plus élevés au printemps-été chez le hamster et le mouton (Gauer *et al.*, 1994b ; Masson-Pévet & Gauer, 1994 ; Piketty, 2001). Il faut cependant noter que les modes de régulation de la présence du MT1 sont très certainement différents entre les SCN et la PT. Alors que le rythme de MT1 est présent en LD dans ces deux structures, il est aboli en DD dans les SCN mais pas dans la PT. A l'inverse, une pinéalectomie abolit les variations journalières de la densité des récepteurs dans la PT mais pas dans les SCN (Gauer *et al.*, 1993a, b ; 1994a ; Guerrero *et al.*, 2000). Ainsi, la présence rythmique du MT1 dépend principalement, dans les SCN, de la présence de lumière (perçue par la rétine) et, dans la PT, de la présence de mélatonine circulante. Enfin, une pinéalectomie provoque à court terme une augmentation de la quantité de MT1 dans ces deux structures suivie à plus long terme d'une diminution (Gauer *et al.*, 1992 ; 1994a) montrant ainsi que la mélatonine est directement impliquée dans le contrôle de ses récepteurs dans la PT mais aussi dans les SCN.

En fonction des espèces, ces récepteurs ne sont pas toujours présents. Chez les hamsters syriens et sibériens, le récepteur MT2 n'est pas fonctionnel du fait d'une double mutation non sens dans la région codante du *Mt2* (Ebisawa *et al.*, 1994 ; Weaver *et al.*, 1996 ; Weaver,

1999). La répartition même de ces récepteurs chez les espèces exprimant le MT1 et le MT2 est également différente. Par exemple dans les SCN, seul le MT1 est présent chez l'homme (Weaver & Reppert, 1996) alors que chez le rat, le MT2 s'exprime également (Wan *et al.*, 1999). De plus, dans les SCN, le MT1 n'est pas représenté de façon homogène. En effet, la majorité des cellules exprimant le MT1, expriment également le récepteur nucléaire RZR β ("Retinoid Z receptor β ") (Becker-Andre *et al.*, 1994 mais voir également Becker-Andre *et al.*, 1997) ; de plus, 16% des cellules à MT1 sont des cellules à AVP alors qu'aucune de ces cellules à MT1 n'exprime la somatostatine (Carlberg & Wiesenberg, 1995 ; Maywood *et al.*, 1995 ; Song *et al.*, 1999). Ainsi, la mélatonine pourrait avoir un effet sur les SCN, préférentiellement sur les neurones à AVP et à RZR β .

2.3.3. Effets de la mélatonine.

Les deux cibles de la mélatonine principalement étudiées sont les SCN et la PT. Comme le [chapitre A.2.4.](#) sera consacré au rôle de la PT et de la relation mélatonine-PT, les résultats concernant la physiologie circadienne et saisonnière de la PT ne seront pas abordés ici.

2.3.3.1. Circadiens.

La réponse journalière de l'organisme à la mélatonine a été étudiée par le biais de la pinéalectomie permettant une privation de mélatonine ou à l'inverse, d'infusions à plus ou moins long terme de mélatonine.

A court terme, l'application de mélatonine (ou d'un agoniste de la mélatonine) **provoque des avances de phases** (1) du rythme d'activité électrique des neurones sur des tranches de SCN en culture mais aussi une réduction de la fréquence de décharges des neurones et de leur excitabilité (Shibata *et al.*, 1989 ; Stehle *et al.*, 1989 ; McArthur *et al.*, 1991, 1997 ; Liu *et al.*, 1997a ; van den Top *et al.*, 2001), (2) du rythme d'expression de *Aa-nat* dans la glande pinéale de rats placés en SP (Humlova & Illnerova, 1990) et (3) du pic de mélatonine mais uniquement si les animaux sont placés en LD (Bothorel *et al.*, 2002). Cassone et coll. (1987, 1988) rapportent également une diminution de la consommation en glucose par les SCN après une injection sous cutanée de mélatonine. Ces différents effets ne font pas intervenir les gènes horloges, tout du moins la synthèse de leurs ARNm car une injection unique de mélatonine ne modifie pas les profils d'expression des gènes horloges dans les premières 24 heures dans les SCN chez le rat (Poirel *et al.*, 2003). En plus des conditions particulières énoncées (LP vs SP,

LD vs LL/DD), **ces avances de phase ne sont possibles que si la mélatonine est injectée en fin de jour** (McArthur *et al.*, 1991, mais voir également McArthur *et al.*, 1997 décrivant une seconde fenêtre d'activation située en fin de nuit ou encore van den Top *et al.*, 2001 ne décrivant pas de rythme de sensibilité). Au niveau des SCN, plusieurs travaux rapportent des voies possibles pour l'action de la mélatonine. D'une part, la PK_C semble prendre part à la voie de signalisation moléculaire sous l'effet de la mélatonine. Des avances de phase de l'activité électrique en fin de jour sont provoquées par l'activation de la PK_C mais par contre, l'inactivation de la PK_C inhibe celles induites par la mélatonine (McArthur *et al.*, 1997). De plus, la mélatonine active la PK_C et cette activation est bloquée par la présence d'antagonistes non spécifiques MT1-MT2 (Hunt *et al.*, 2001). D'autre part, l'application de mélatonine sur des cultures de SCN diminue la fréquence de décharge de ces neurones (Liu *et al.*, 1997a) mais semble également augmenter l'amplitude des courants électriques dus au récepteur GABA_A (Wan *et al.*, 1999). Cette augmentation d'amplitude est spécifique aux SCN (MT1 majoritaire chez le rat) et dans des cellules HEK293 exprimant le MT1. En effet, l'amplitude des courants induits par le récepteur GABA_A sont diminués dans l'hippocampe du rat (uniquement MT2) et dans des cellules HEK293 exprimant le MT2, en présence de mélatonine (Wan *et al.*, 1999). D'autres études ont montré que la présence d'antagonistes non spécifiques MT1-MT2 bloquent les avances de phase du rythme d'activité des neurones des SCN montrant ainsi leurs implications probables dans ces phénomènes (Dubocovich *et al.*, 1998 ; Weibel *et al.*, 1999 ; Hunt *et al.*, 2001).

La mélatonine peut donc agir au moins par l'intermédiaire des récepteurs MT1 et MT2. Dans le but de distinguer leur rôle respectif au niveau des SCN, des souris mutantes *Mt1*^{-/-} ont été utilisées. Sur des tranches hypothalamiques provenant de ces souris *Mt1*^{-/-}, l'effet inhibiteur de la mélatonine en terme de fréquence de décharge des neurones est diminué, et les décalages de phase induits sont moindres mais persistent (Liu *et al.*, 1997a). Ils sont cependant inhibés par l'application d'un antagoniste spécifique du MT2 (Hunt *et al.*, 2001). La diminution de la fréquence de décharge des neurones des SCN par la mélatonine n'est, de plus, pas affectée par une mutation *Mt2*^{-/-} (Jin *et al.*, 2003). Ainsi, le récepteur MT1 jouerait un rôle dans l'inhibition de l'activité électrique des neurones des SCN et le récepteur MT2 des SCN permettrait l'apparition de ces décalages de phase. Cependant, chez le hamster sibérien, chez lequel le récepteur MT2 n'est pas fonctionnel, les décalages de phase induits par la mélatonine persistent (Weaver *et al.*, 1996). Et, chez le hamster syrien, qui ne semble pas non plus présenter de récepteur MT2 fonctionnel, l'injection de mélatonine peut entraîner les

rythmes circadiens chez les nouveau-nés (Grosse *et al.*, 1996) mais pas, à court terme, chez l'adulte (Hastings *et al.*, 1992). Cette différence est en relation avec le fait que la fixation de mélatonine au niveau des SCN n'est possible que chez l'embryon et le nouveau-né mais n'est plus possible à partir du 12^{ème} jour post-natal (Duncan & Davis, 1993).

L'effet chronobiotique de la mélatonine à **long terme** qui a été certainement le mieux démontré est sa capacité à entraîner le rythme d'activité locomotrice du rat et de *Arvicanthis ansorgei* (Redman, 1997 ; Slotten *et al.*, 2000, 2002). Cet entraînement, représenté [figure 33](#), est possible à condition que les animaux soient placés en conditions constantes de lumière ou d'obscurité. Comme le montre la [figure 33](#), l'entraînement à 24h n'est pas immédiat, il n'intervient que lorsque l'heure d'injection quotidienne ou d'infusion ou encore de présence de mélatonine dans l'eau de boisson, coïncide avec le début de l'activité locomotrice (Redman *et al.*, 1983 ; Mrosovsky, 1996 ; Rajaratnam & Redman, 1997 ; Slotten *et al.*, 2002). Une infusion de mélatonine ou de l'un de ses agonistes pendant 1h, 8h ou deux fois 1h séparées de 8h, par jour permet d'entraîner le rythme d'activité locomotrice du rat (Pitrosky *et al.*, 1999). La durée d'infusion journalière de mélatonine ne semble pas être la condition limitante mais il est à noter qu'une infusion de 16h par jour n'entraîne pas la moitié des animaux (Pitrosky *et al.*, 1999). Concernant l'effet de la dose de mélatonine employée, Cassone et coll. (1986b) ont montré que les rats présentaient une réponse de type "tout ou rien" puisqu'ils sont soit entraînés, soit pas du tout, mais il n'y a pas d'entraînement partiel. Chez le hamster syrien, l'entraînement par la mélatonine est beaucoup moins évident. Les animaux ne sont pas sensibles à l'injection pendant environ une 100^{aine} de jours, puis peuvent être entraînés pendant seulement quelques jours à la suite de quoi, certains animaux ne le restent pas et la période endogène de ces animaux est de nouveau exprimée (Turek *et al.*, 1982 ; Armstrong & Redman, 1985 ; Kirsch *et al.*, 1993 ; Schuhler *et al.*, 2002).

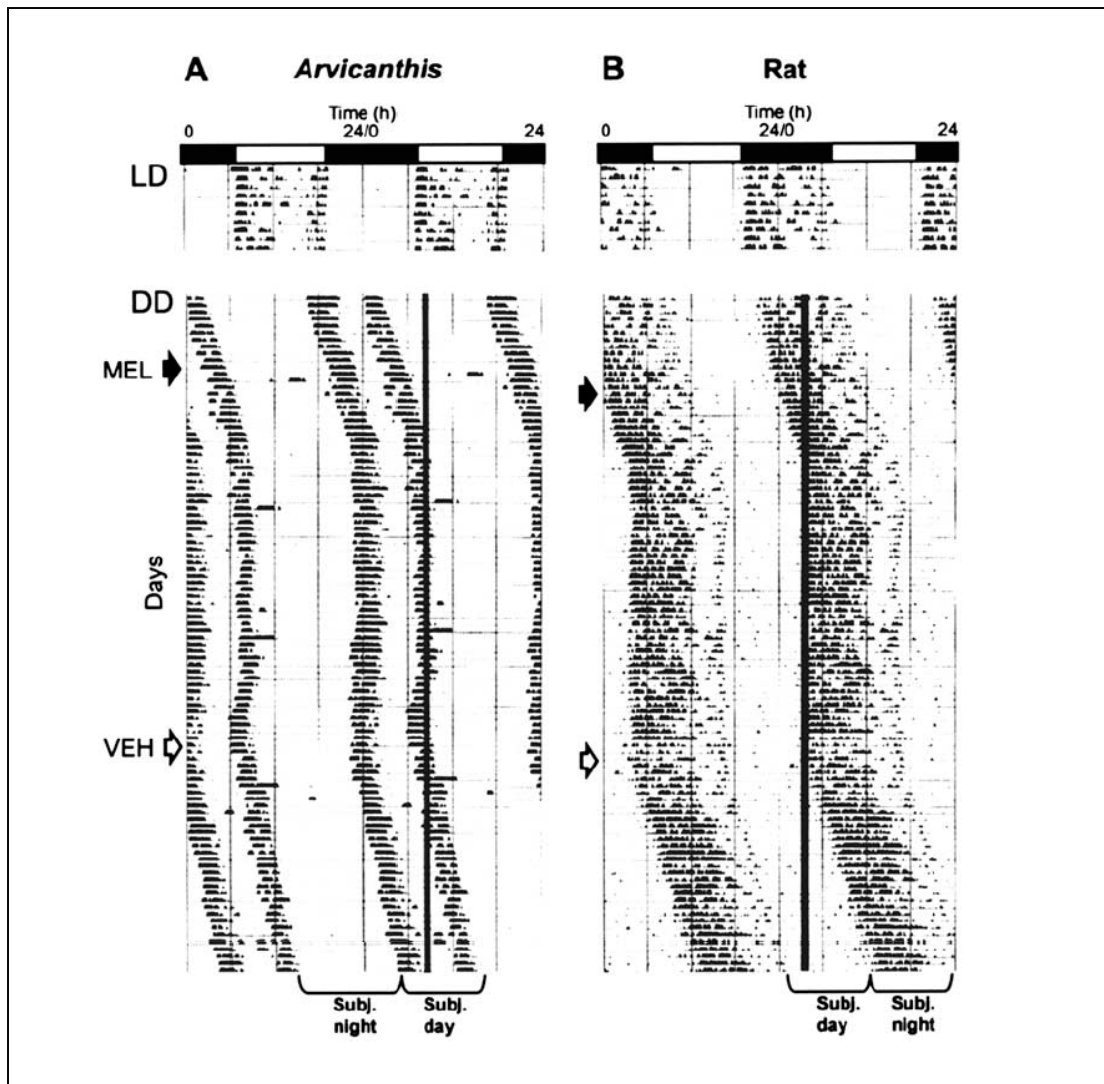


Figure 33 : Entraînement de l'activité locomotrice du rat et de *Arvicanthis ansorgei* en conditions constantes (d'après Slotten et al., 2000, 2002).

Actogrammes en double-représentation de l'activité locomotrice de roue chez un rongeur diurne, *Arvicanthis ansorgei* (A), et un nocturne, le rat (B). En haut, l'enregistrement est effectué en conditions LD et en bas en DD. En DD, une solution de mélatonine (MEL) ou son solvant seul (VEH), sont appliqués à partir du moment indiqué par la flèche et pendant une durée indiquée par la barre noire verticale. L'entraînement est réalisé par avances de phase chez le rongeur diurne, et par retard de phase chez le nocturne.

Concernant les différents effets circadiens provoqués par la mélatonine que nous venons de décrire, certaines limites aux conclusions doivent être mentionnées. (1), ces effets ne sont possibles qu'en utilisant des doses pharmacologiques de mélatonine. (2), ces effets ne sont observés qu'en conditions particulières (étude effectuée uniquement en SP pour le rythme d'expression d'*Aa-nat*, effets différents entre LD et DD pour celui de mélatonine endogène). Et, (3), les effets les plus marqués sont restreints à une fenêtre temporelle située en fin de jour, un horaire où normalement, la mélatonine endogène n'est pas produite...

En complément de ces manipulations, des études avec des animaux pinéalectomisés, donc ne présentant plus de synthèse de mélatonine endogène, ont été menées. Bien que des injections quotidiennes de mélatonine permettent d'entraîner le rythme d'activité locomotrice, une pinéalectomie n'inhibe pas ce rythme (Quay, 1970). La mélatonine ne permettrait donc qu'une synchronisation de cette activité. Le ré-entraînement des animaux après un décalage de phase du cycle LD, est perturbé chez les animaux pinéalectomisés (Redman & Armstrong, 1988) et les souris ne produisant pas de mélatonine ont des amplitudes de réponse à un créneau lumineux, plus importantes que chez les souris qui en produisent (von Gall *et al.*, 1998), montrant ainsi l'implication de la mélatonine dans le rythme d'activité locomotrice. Il est à noter que ces effets ne sont possibles que si les SCN n'ont pas été préalablement lésés (Cassone *et al.*, 1986a). En ce qui concerne l'activité électrique des neurones des SCN, une ablation de la glande pinéale induit une diminution de leurs fréquences de décharges (Rusak & Yu, 1993) mais n'affecte pas l'expression de *Per1* (Messenger *et al.*, 2001). La mélatonine semble également intervenir dans d'autres fonctions, par exemple, la réponse des cellules adipocytaires à l'insuline est modifiée après une pinéalectomie (Lima *et al.*, 1988).

Les effets circadiens de la mélatonine ont été mesurés principalement dans les SCN, la glande pinéale et au niveau de l'activité locomotrice. Or, l'activité de la glande pinéale comme l'activité locomotrice sont sous le contrôle des SCN. Ainsi, l'ensemble des effets rapportés ici pourrait être dû à une action de la mélatonine sur les SCN. Ceux-ci diffuseraient ensuite des signaux efférents adaptés conduisant aux modifications des rythmes d'expression de *Aa-nat*, d'activité locomotrice...

Comme l'activité circadienne des SCN dépend de l'expression des gènes horloges, nous avons cherché si la mélatonine permet de modifier leur expression.

2.3.3.2. Saisonniers.

◆ *Un rôle essentiel*

L'effet le plus remarquable de la mélatonine est sa capacité à entraîner le rythme annuel d'activité sexuelle chez les animaux photopériodiques (pour revue, Pévet, 2003). De nombreuses études ont permis de démontrer qu'une augmentation de la durée du pic de mélatonine a pour conséquence d'entraîner une augmentation ou une réduction de la taille des testicules chez les espèces "jours courts" et de "jours longs", respectivement. Chez des hamsters sibériens et syriens entraînés par une LP et préalablement pinéalectomisés, une infusion de mélatonine de type LP (6h) ne provoque pas de décroissance de la taille des testicules tandis qu'une infusion de type SP (16h) l'induit (Bartness *et al.*, 1993). Des injections de mélatonine, effectuées en fin de jour ou en fin de nuit, à des hamsters syriens placés en LP, permettent d'augmenter la durée totale du signal mélatoninergique et provoquent ainsi la décroissance testiculaire tandis que des injections effectuées de jour sont sans effet (Tamarkin *et al.*, 1976 ; Gauer *et al.*, 1994b). Notre laboratoire s'est intéressé à déterminer si la durée du signal mélatoninergique est importante ou si la présence de mélatonine à un moment précis du cycle LD est déterminante, conformément au modèle de coïncidence externe décrit dans le cas des SCN. Des hamsters syriens pinéalectomisés, sont placés en LP ou en SP et reçoivent quotidiennement deux infusions de mélatonine pendant 2h30, séparées de 3 ou 5h30 (groupe A et B, respectivement). Dans les deux cas, les taux sériques de mélatonine entre les deux injections redescendent à des niveaux mesurés normalement de jour, mettant ainsi en évidence qu'il ne peut y avoir d'effets additifs des deux infusions. Les animaux du groupe A montrent une décroissance testiculaire mais pas ceux du groupe B (Pitrosky *et al.*, 1995). Ainsi, la durée du signal mélatoninergique n'est pas (dans une certaine limite) le facteur limitant mais c'est sa présence à des moments précis du cycle LD qui semble être l'élément déterminant de la physiologie saisonnière, au moins en terme d'activité sexuelle et, chez le hamster syrien. Bien que physiologiquement, l'apparition d'un signal long de mélatonine soit nécessaire à la réduction testiculaire, une pinéalectomie chez des hamsters sibériens placés en SP, ne permet pas de stopper la diminution testiculaire amorcée avant l'opération (Duncan, 1998), montrant ainsi que la mélatonine est essentielle à l'induction d'une physiologie reproductive de type SP mais pas à sa réalisation. Enfin, chez le mouton, l'allongement du pic de mélatonine produit à l'inverse une restauration de l'activité sexuelle (Bittman *et al.*, 1985). La raison pour laquelle un signal long de mélatonine permet

une inhibition ou une activation de la croissance testiculaire, en fonction des espèces, demeure encore inconnue.

En plus de son effet sur l'activité sexuelle, la mélatonine intervient également dans le contrôle de la couleur du pelage chez le hamster sibérien (Hoffman, 1979). L'activité locomotrice présente également une variation photopériodique et ces variations persistent après pinéalectomie (Hastings *et al.*, 1987).

◆ *Rôle particulier de certaines structures*

Plusieurs structures cérébrales sont nécessaires à l'obtention d'une physiologie de type SP. Une lésion d'une partie de l'hypothalamus (au niveau des noyaux dorso-médians) chez le hamster syrien placé en LP et perfusé quotidiennement à la mélatonine avec une durée de type SP, inhibe l'adaptation de la taille des testicules mais pas celle de la prolactine (PRL) qui devient de type SP (Maywood & Hastings, 1995). De la même façon, chez le mouton, des implants de mélatonine dans l'hypothalamus médio-basal ont un effet sur l'activité sexuelle mais pas sur celle de PRL alors que les implants situés à proximité de la PT ont un effet sur la PRL (Malpaux *et al.*, 1993). Une seconde étude a permis de montrer que l'aire pré-mammillaire de l'hypothalamus intervient comme médiateur entre la mélatonine et l'état d'activité sexuelle (Malpaux *et al.*, 1998). Ainsi, le contrôle de l'activité sexuelle par la mélatonine fait intervenir des cibles hypothalamiques autant chez les rongeurs que chez le mouton (pour revues, Malpaux *et al.*, 2001).

Les SCN pourraient également être une cible de la mélatonine en terme saisonnier. La démonstration n'est pas aisée puisque les rythmes mêmes de mélatonine dépendent de l'intégrité des SCN, il est donc difficile de mettre en évidence un rétro-contrôle, dépendant des saisons, de la mélatonine sur les SCN. Mais, chez le sibérien, une pinéalectomie n'empêche pas la diminution de l'expression de l'*Avp* et de celle de *Vip* provoquée par la SP (Duncan, 1998). Cependant, la pinéalectomie semble diminuer l'expression de l'*Avp* en SP comme en LP et augmenter celle du *Vip* mais qu'en LP. Ces résultats montrant une sensibilité photopériodique des SCN à la mélatonine en terme d'expression du *Vip* mais pas de l'*Avp* sont cependant à prendre avec précautions car, dans cette étude, les prélèvements des animaux n'ont été effectués qu'à un seul point horaire. Toujours chez le hamster sibérien, les SCN semblent même jouer un rôle important dans la transmission de message mélatoninergique. En effet, des injections intracérébrales de mélatonine localisées n'auront un effet sur la taille des gonades et sur les quantités de PRL produites que si elles sont effectuées au niveau même

des SCN (Badura & Goldman, 1992). Les mécanismes d'action semblent cependant différents entre les hamsters sibérien et syrien. La décroissance de la taille testiculaire normalement provoquée par l'infusion de mélatonine pendant 16h est inhibée chez le hamster sibérien par une lésion des SCN ou de l'hypothalamus médio-basal tandis que chez le hamster syrien, elle est inhibée par une lésion d'une partie de l'hypothalamus antérieur seulement (Bartness *et al.*, 1991 ; Maywood & Hastings, 1995 ; Song & Bartness, 1996). Nous avons vu précédemment ([chapitre A.2.2.3.](#)) que la phase de photoinductibilité de *c-fos* dans les SCN dépend des saisons. La durée de cette phase et la variation de cette durée, après un transfert des animaux d'une LP à une SP, ne dépend pas de la présence de la glande pinéale mais est bien due à un effet direct de la photopériode sur les SCN (Sumova *et al.*, 1995a, b ; Sumova & Illnerova., 1996 ; Jacob *et al.*, 1997). Ainsi, l'effet saisonnier de la mélatonine sur l'horloge centrale reste en suspens.

◆ *D'autres effecteurs saisonniers*

Pendant très longtemps, seule la mélatonine était considérée comme l'hormone donneuse de temps, c'est à dire permettant aux animaux de se repérer dans le temps journalier (la mélatonine n'étant présente que de nuit) et saisonnier (sa durée de libération étant fonction de la durée de la nuit). Bien que cette hormone soit essentielle à l'apparition des fonctions physiologiques saisonnières, elle n'est pas la seule à pouvoir être qualifiée de "donneuse de temps". Des données laissent supposer que les hormones thyroïdiennes pourraient également intervenir dans le photopériodisme. Par exemple, l'expression de certains gènes contrôlés par la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes dépendent du temps journalier et des saisons (Panda *et al.*, 2002a ; Prendergast *et al.*, 2002, Ross *et al.*, 2004). La forme active T₃ ("Triiodothyronine") est synthétisée à partir de la T₄ ("Thyroxine") par l'action de la DIO2 ("Deiodinase 2"). Et, la DIO3 ("Deiodinase 3") permet la conversion de la T₄ circulante en rT₃ inactive ("reverse Triiodothyronine"). Chez les mammifères, l'activité de la DIO2 et des quantités de T₄ circulante dépendent de la photopériode (Ahlersova *et al.*, 1991, 1997 ; Tu *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 2004) ce qui laisse supposer que la régulation du passage de T₄ à rT₃/T₃ pourrait dépendre de la photopériode. Chez la caille, il a d'ailleurs été montré que la balance d'activité entre la DIO2 et la DIO3, positive en LP et négative en SP, permettrait des adaptations saisonnières (Yasuo *et al.*, 2005, et pour revue sur le contrôle saisonnier par DIO2/DIO3, Hazlerigg & Wagner, 2006).

2.4. LA PARS TUBERALIS.

La *Pars tuberalis* (PT) de l'adénohypophyse est un tissu endocrine qui s'étend de l'éminence médiane à la tige pituitaire, formée rostralement de deux groupes latéraux de cellules se réunissant en un seul feuillet qui borde et entoure la tige pituitaire (voir [figure 34](#)). Séparée de la *Pars distalis* par un tissu conjonctif où les vaisseaux du système porte hypothalamo-hypophysaire pénètrent, la PT est fortement vascularisée (pour revues, Stoeckel *et al.*, 1979 ; Burrows *et al.*, 1999).

La forte expression des récepteurs de la mélatonine dans ce tissu mais aussi la régulation de leur expression par la mélatonine font de la PT, un modèle unique d'études du contrôle des fonctions saisonnières par la mélatonine. De ce fait, après une description de la PT, nous présenterons le rôle important de la PT dans la physiologie saisonnière et son contrôle par la mélatonine.

2.4.1. Expression génique.

La PT exprime donc les récepteurs de la mélatonine chez tous les mammifères étudiés avec une différence d'expression à la fois journalière et saisonnière (Gauer *et al.*, 1993a,b ; Masson-Pévet & Gauer, 1994 ; Piketty, 2001 ; Dardente *et al.*, 2003b). Des injections de mélatonine, ou au contraire, des pinéalectomies ou des suppressions du pic de mélatonine (LL ou créneau lumineux de nuit), produisent respectivement des diminutions ou des augmentations à court terme de la densité des récepteurs (Gauer *et al.*, 1992, 1994a, Recio *et al.*, 1998a,b ; Guerrero *et al.*, 2000). Outre les récepteurs de la mélatonine, les cellules de la PT expriment essentiellement la β -TSH, la β -LH, la β -FSH et leur sous-unité commune, l' α -GSU. Cependant, des différences entre espèces existent et aussi du point de vue de l'adaptation photopériodique. La β -TSH et l' α -GSU sont exprimées chez de nombreuses espèces (rat : Gross, 1983, Stoeckel *et al.*, 1994 ; souris : Stoeckel *et al.*, 1994 ; Bockmann *et al.*, 1997 ; hamster sibérien : Bergmann *et al.*, 1989 ; Bockman *et al.*, 1996 ; mouton : Lincoln *et al.*, 2005) tandis que la β -LH et la β -FSH sont exprimées fortement chez le mouton (Bockers *et al.*, 1996) ou en faibles quantités chez le rat (Gross, 1983) ou même pas du tout chez le hamster sibérien (Wittkowski *et al.*, 1988). Un raccourcissement de la photopériode ou des injections de mélatonine, entraînent une réduction des niveaux de β -TSH et d' α -GSU chez le mouton et les hamsters, sibérien et d'Europe (Bockman *et al.*, 1996 ; Bergmann *et al.*,

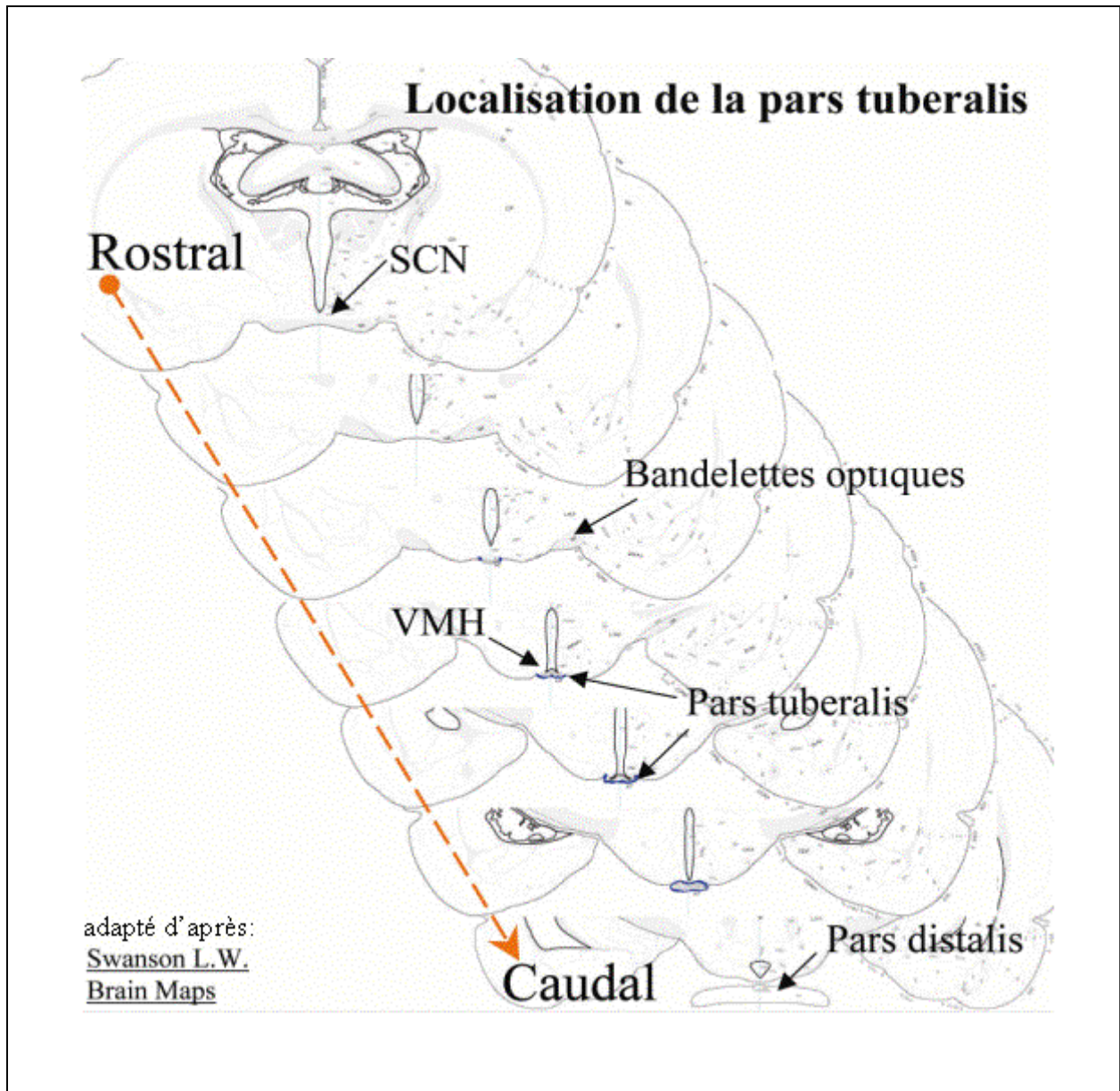


Figure 34 : Localisation de la Pars tuberalis suivant un axe rostro-caudal.

La forme de la *Pars tuberalis*, représentée ici chez le rat, varie en fonction de l'axe rostro-caudal. Deux groupes latéraux de cellules se réunissent en un seul feuillet qui borde et entoure la tige pituitaire. VMH, noyaux hypothalamiques ventromédians.

1989 ; Wittkowski *et al.*, 1988 ; Bockers *et al.*, 1995 ; Dardente *et al.*, 2003b ; Lincoln *et al.*, 2005) mais pas de β -LH ni de β -FSH chez le hamster d'Europe, Dardente *et al.*, 2003b). Ce résultat peut-être dû au fait que, au moins chez cette dernière espèce, seules β -TSH et α -GSU colocalisent avec MT1 qui lui aussi, en SP, présente une réduction de son expression (Klosen *et al.*, 2002 ; Dardente *et al.*, 2003b).

2.4.2. Contrôle de la libération de PRL.

La PRL présente des variations plasmatiques saisonnières chez les animaux de jours courts et de jours longs avec des valeurs maximales obtenues en LP dans les deux cas (pour revue, Lincoln *et al.*, 2003b, c). Elle est produite par la *Pars distalis* et est impliquée dans de nombreuses variations saisonnières comme le changement de couleur de pelage ou la mue (pour revues : Duncan & Goldman, 1984a, b ; Lincoln *et al.*, 1996 ; Lincoln & Richardson, 1998). Comme la mélatonine présente une synthèse journalière directement sous le contrôle des SCN, l'hypothèse selon laquelle la mélatonine contrôle négativement le rythme saisonnier de PRL a été émise. Cependant, la *Pars distalis*, ne possède pas de récepteurs de la mélatonine à l'état adulte ; l'effet de cette dernière est donc indirect (Vanecek, 1988 ; Vanecek & Kosar, 1994). Comme la PT exprime fortement les récepteurs de la mélatonine, il apparaissait fortement probable que le contrôle de la libération de PRL par la mélatonine passait par un relais au niveau de la PT (Gross *et al.*, 1984 et pour revue, Masson-Pévet & Gauer, 1994). Cette hypothèse a été largement vérifiée par des études *in vitro* comme *in vivo*. En effet, *in vitro*, les cellules de la PT ne libèrent pas de PRL mais stimulent la libération de PRL par les cellules de la *Pars distalis* lors de co-cultures (Hazlerigg *et al.*, 1996 ; Morgan *et al.*, 1996 ; Stirland *et al.*, 2001). *In vivo*, l'équipe de B. Malpoux a montré l'importance de la PT pour le contrôle de la PRL et sa non-intervention dans le contrôle de la reproduction (Malpoux *et al.*, 1994, 1995). A l'aide de micro-implants de mélatonine, ils ont montré qu'en fonction de sa localisation, les effets sur la libération de PRL et de LH ("Luteinizing hormone", régulant la synthèse de testostérone donc marqueur de la régulation de l'activité sexuelle) sont différents. Des implants localisés dans la *Pars tuberalis* diminuent les quantités produites de PRL mais sont sans effet sur celles de LH tandis que des implants localisés dans le troisième ventricule et hypothalamus médio-basal provoquent une réponse de la PRL et de la LH. Cette adaptation physiologique de la PRL sous la dépendance de la mélatonine, a été confirmé par d'autres protocoles d'injection de mélatonine et par déconnection hypothalamo-pituitaire ("DHP") chez le mouton (Lincoln, 1994 ; Lincoln & Clarke, 1994, 1995). Chez la

souris, la mutation *Mt1*^{-/-} permet une augmentation des quantités plasmatiques en PRL (Von Gall *et al.*, 2002) confirmant l'implication de la mélatonine et des récepteurs MT1 de la *Pars tuberalis* dans le contrôle de la sécrétion de PRL.

L'étape suivante a consisté à (tenter de) mettre en évidence les molécules responsables de la régulation de la PRL par la PT. Comme le nombre des cellules exprimant l' α -GSU est supérieur à celui des cellules exprimant les sous-unités β , l'idée que l' α -GSU puisse avoir un effet propre avait été évoquée (Begeot *et al.*, 1984) et par la suite confortée par le fait que cette sous-unité pouvait stimuler la libération de PRL par la *Pars distalis*, chez le mouton mais uniquement à l'état embryonnaire (Morgan *et al.*, 1996 ; Chabot *et al.*, 2001). Mais, comme ce système ne fonctionne pas à l'état adulte, une autre molécule, encore non identifiée et appelée tubéraline, serait responsable de la connection fonctionnelle entre la PT et la *Pars distalis* (Stoeckel *et al.*, 1994). L'existence même d'une telle molécule a été montrée par Guerra & Rodriguez (2001) qui ont mis en évidence deux protéines libérées par la PT, mais dont l'identification n'a toujours pas été effectuée.

2.4.3. Gènes horloges et...régulation par la mélatonine.

2.4.3.1. Expression des gènes horloges.

Per1 présente une expression rythmique dans la PT en LP avec un maximum obtenu en fin de nuit/début de jour chez toutes les espèces étudiées (souris : Sun *et al.*, 1997, von Gall *et al.*, 2002 ; hamster syrien : Messenger *et al.*, 1999 ; Johnston *et al.*, 2003 ; hamster sibérien : Messenger *et al.*, 2000 ; Johnston *et al.*, 2005 ; mouton : Morgan *et al.*, 1998 ; Lincoln *et al.*, 2002). En revanche, le passage vers une photopériode courte provoque des effets différents en fonction des espèces. Chez le hamster sibérien, la SP s'accompagne d'une arythmie de son expression, présentant alors toujours des valeurs minimales (ARNm : Messenger *et al.*, 2000, Johnston *et al.*, 2005, protéine : Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000). Chez le hamster syrien, l'expression est fortement diminuée en amplitude mais reste rythmique et centrée sur le début de jour (Messenger *et al.*, 1999). Chez le mouton, le rythme présentant des valeurs maximales en début de jour persiste mais il est de plus faible amplitude (Morgan *et al.*, 1998 ; Lincoln *et al.*, 2002).

Per1 n'est bien entendu pas le seul gène horloge exprimé dans la PT. En effet, les gènes *Cry1*, *Bmall* et *Clock* sont exprimés rythmiquement, et les gènes *Per2* et *Cry2* de façon constitutive

dans la PT chez la souris (von Gall *et al.*, 2005 ; mais voir aussi dans le cas de *Per2*, Albrecht *et al.*, 1997). Chez le mouton, les gènes *Cry1*, *Bmal1*, *Clock*, *Per2* et *Cry2* sont tous exprimés de façon rythmique.

2.4.3.2. Contrôle de l'expression des gènes horloges.

Une première preuve indirecte du contrôle par la mélatonine de l'expression d'un gène horloge, *Per1*, dans la PT, est le fait que son expression présente chez les souris WT est inexistante chez les souris déficientes en mélatonine (Sun *et al.*, 1997) comme chez les souris *Mt1^{-/-}* (von Gall *et al.*, 2002). Une démonstration plus claire fut apportée par des protocoles d'injections de mélatonine. Une injection unique de mélatonine effectuée en fin de nuit, suffit à abolir le pic de *Per1* normalement présent en début de jour, chez le hamster syrien (Messenger *et al.*, 1999) et une injection en fin de jour, inhibe en partie le pic de *Per1* et induit l'expression de *Cry1* chez le rat (Dardente *et al.*, 2003a). Ainsi, *Per1* et *Cry1* semblent directement mais inversement régulés par la mélatonine.

Au niveau des SCN ou de la glande pinéale, une augmentation des taux d'AMPC intracellulaire permet d'induire une expression de *Per1* (SCN : voir [chapitre A.1.4.3.](#), glande pinéale : von Gall *et al.*, 2001). Qu'en est-il au niveau de la PT ? Pour répondre à cette question, Morgan et coll. (1998) ont mis en culture des cellules de PT de mouton et les ont traitées avec de la forskoline, il s'en suit une augmentation de l'expression de *Per1*. De plus, cet effet de la forskoline est (1) indépendant de la synthèse de protéine (montré par application de CHX) et (2) bloqué par un traitement à la mélatonine qui, seule, n'a aucun effet (Morgan *et al.*, 1998). L'expression de *Per1* est donc augmentée par la voie AMPc (induite par la forskoline) et la mélatonine agit en inhibant l'activation de cette voie. Les cellules de la PT expriment des récepteurs adrénergiques de type A_{2b} (Stehle *et al.*, 1992) et leur activation spécifique (par le NECA, "5'-(N-ethyl)-carboxamido α adenosine") provoque une augmentation des taux d'AMPC et de P-CREB puis de ceux d'ARNm de *Per1* (von Gall *et al.*, 2002). Un traitement avec des inhibiteurs de la PK_A ou des antagonistes de l'AMPc inhibe ces différents effets. Ainsi, **le contrôle de l'expression de *Per1* est dû à une voie activatrice (via les récepteurs adrénergiques de type A_{2b}) et à l'inhibition de cette voie par la mélatonine.** Un autre protocole a testé l'importance de l'influence de la mélatonine sur l'expression de *Per1* et de *Cry1* dans la PT du mouton. Les animaux provenant de SP8:16 sont placés en LP16:8 le jour des prélèvements (en retardant de 8h l'arrivée de la nuit). Ce protocole permet

ainsi une inhibition directe d'une partie du pic de mélatonine (le début du pic étant retardé de 8h). Ce premier jour de LP (LP1d) provoque une réponse directe de la PT : le pic d'ARNm de *Per1* reste centré sur l'arrivée du jour et celui de *Cry1* est retardé, synchronisé avec l'arrivée de la nouvelle nuit. De plus, une injection de mélatonine inhibe cet effet du premier jour de LP sur l'expression de *Cry1* (Hazlerigg *et al.*, 2004). **On peut alors en déduire que la mélatonine active la transcription de *Cry1*.** Une analyse récente des profils d'expression des gènes horloges dans la PT de souris sauvages, *Mt1^{-/-}* et *Mt2^{-/-}* a permis de montrer que seul le récepteur MT1 est essentiel (von Gall *et al.*, 2005). L'expression journalière de *Per1*, *Cry1*, *Clock* et de *Bmal1* n'est pas affectée par la mutation de MT2 mais est inhibée chez les mutants du récepteur MT1.

Cependant, différents résultats doivent être pris en considération pour moduler ces conclusions. Une pinéalectomie abolit le rythme de *Per1* dont les niveaux sont toujours faibles chez les souris (von Gall *et al.*, 2002) et les hamsters syriens (Messenger *et al.*, 2001) alors que l'on aurait pu s'attendre à une expression non rythmique mais avec des niveaux élevés (voir [figure 35](#)). De plus, si la pinéalectomie est suivie d'une injection unique de mélatonine de nuit, après un délai de 7 jours, *Per1* n'est plus exprimé dans la PT (Messenger *et al.*, 2001). Chez le hamster sibérien pinéalectomisé, von Gall et coll. (2002) ont injecté quotidiennement de la mélatonine à ZT20, depuis le jour de l'opération jusqu'au sacrifice. Dans ce cas, l'expression de *Per1* persiste (montré en ARNm et en protéine) avec des valeurs intermédiaires entre celles mesurées pour des animaux non pinéalectomisés et celles mesurées pour des animaux pinéalectomisés mais non injectés à la mélatonine. **La mélatonine aurait donc un effet activateur de *Per1* à long terme.** Confortant cette hypothèse, un prétraitement à la mélatonine (mimant la nuit physiologique) permet une expression plus importante de *Per1* sur des cellules de PT murines stimulées par le NECA (von Gall *et al.*, 2002). Concernant l'expression de *Cry1*, elle apparaît activée par la mélatonine mais bien que le pic de mélatonine persiste quasiment tout au long de la nuit, celui de *Cry1* n'est que transitoire (voir [figure 35A](#)). De plus, au regard de l'expression de *Rev-erba* en SP, LP et en LP1d (pic en fin de nuit en SP et en LP et en fin de jour en LP1d, voir [figure 35B](#) d'après Hazlerigg *et al.*, 2004), il semble possible que les effets de la mélatonine soient restreints à des fenêtres d'activation. La PT présenterait ainsi un rythme de sensibilité à la mélatonine. En effet, si la mélatonine inhibe l'expression de *Rev-erba* pendant la première moitié de la nuit en SP (soit de ZT6 à environ ZT16), le pic d'ARNm de *Rev-erba* se produit en fin de nuit (vers ZT20),

ce qui est le cas chez le mouton. En retardant l'arrivée de la nuit de 8h (LP1d), la mélatonine ne peut plus inhiber *Rev-erba* de ZT6 à ZT14 (puisque'elle n'est pas encore produite), *Rev-erba* peut donc s'exprimer. Or, en LP1d, le pic d'ARNm de *Rev-erba* est situé vers ZT15, soit en fin de jour. Par la suite, l'intégration de la LP imposerait à la fenêtre de sensibilité de se décaler pour être de nouveau présente en début de nuit. Ainsi, le pic de *Rev-erba* se décalerait lui aussi en LP pour être de nouveau situé en fin de nuit, comme en SP.

En conclusion, pour la régulation par la mélatonine de l'expression des gènes horloges dans la PT, il apparaît donc qu'à court terme, elle active ou inhibe les expressions de *Cry1* et de *Per1*, respectivement. En revanche, après quelques heures, la mélatonine n'active plus *Cry1*, et sa présence journalière est nécessaire au rythme de *Per1*. De plus, la mélatonine permet soit d'induire les rythmes d'expression des gènes horloges soit de synchroniser les cellules de la PT entre elles. En effet, l'abolition de l'expression de *Per1* une semaine après la inéalectomie, peut résulter soit d'une perte de l'induction de la rythmicité soit d'une perte de la synchronisation des rythmes cellulaires individuels. On remarquera que cette hypothèse est exactement la même que celle qui avait été faite pour expliquer le rôle, sur l'expression des gènes horloges, d'un choc au sérum sur des fibroblastes en culture (voir [figure 36](#)). Pour le savoir, des enregistrements au niveau cellulaire, comme ceux décrits dans l'étude des oscillations des gènes horloges dans les organes périphériques, devraient être menés, ou peut-être que des protocoles particuliers d'activation/inhibition des taux de mélatonine circulants pourraient conforter l'une de ces hypothèses...

Au cours de ma thèse, nous avons donc cherché si la mélatonine a un effet direct sur l'expression des gènes horloges dans la PT.

2.4.3.3. Modèle de coïncidence interne.

D'après les résultats obtenus dans deux conditions photopériodiques chez le mouton (Lincoln *et al.*, 2002), le modèle de coïncidence interne déjà évoqué pour les SCN, trouve un nouveau support dans la PT, pour la mesure du temps photopériodique. Comme le pic d'expression de *Per1* reste centré sur le début de jour (c'est à dire lorsque les niveaux de mélatonine diminuent) et celui de *Cry1* sur le début de nuit (lorsque les niveaux de mélatonine augmentent), la relation de phase entre les pics d'ARNm de *Per1* et de *Cry1* change avec la photopériode, 12h de décalage en LP16:8 contre 8h en SP8:16 (Lincoln *et al.*, 2002). Ainsi, le groupe de Lincoln (2002, 2003a,c) a suggéré un modèle de décodage de la photopériode (du

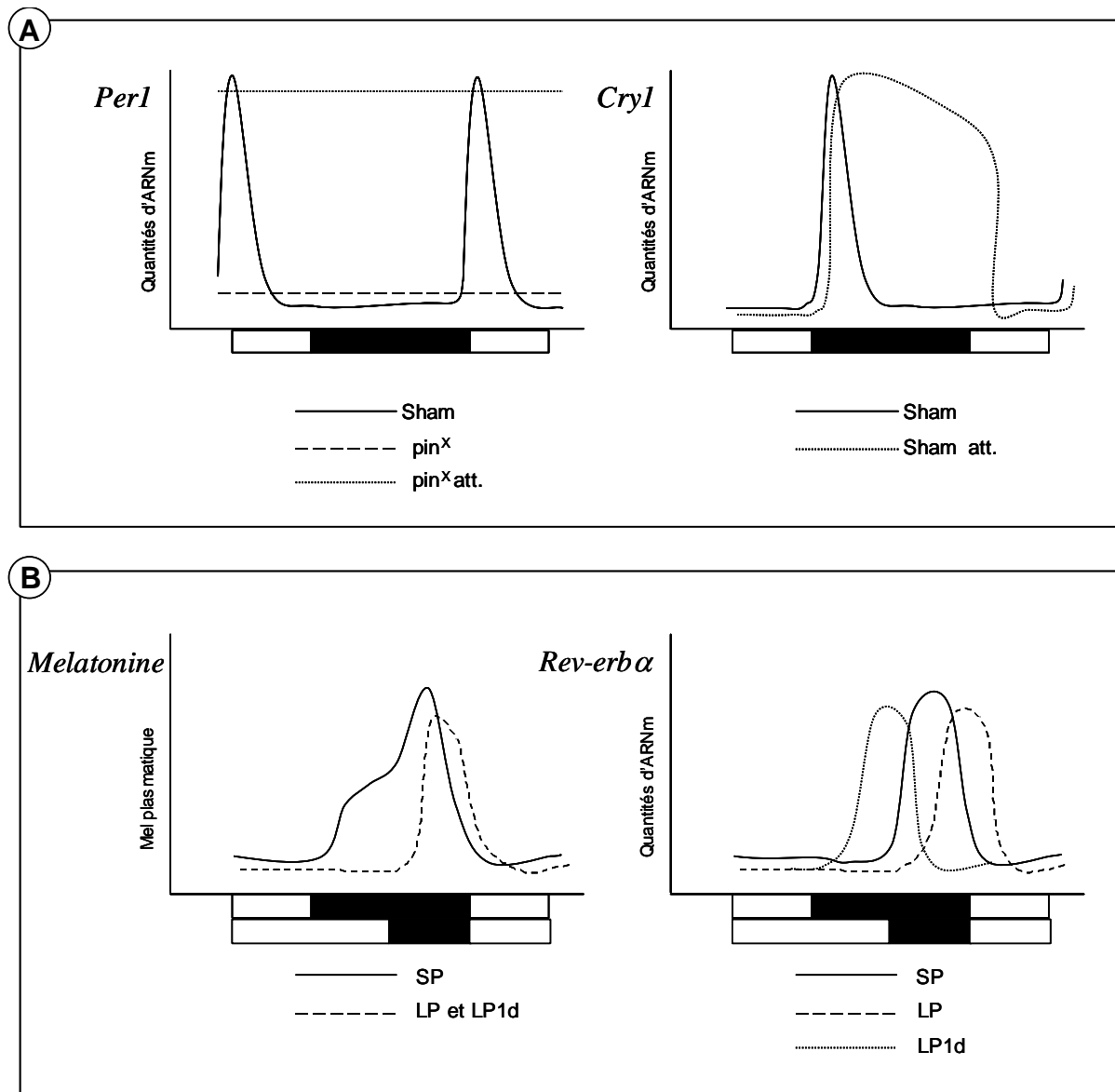


Figure 35 : Effets activateur et inhibiteur de la mélatonine sur l'expression des gènes horloges dans la Pars tuberalis.

Les barres horizontales noires et blanches représentent les périodes d'obscurité et de lumière respectivement, d'un cycle LD. **A.** Effets attendus (att.) et obtenus dans la situation normale (sham) ou pinéalectomisés (pin^X) pour l'expression de *Per1* et de *Cry1*. **B.** Variations journalières de la mélatonine (mel) plasmatique et des niveaux d'ARNm de *Rev-erba* en conditions SP, LP ou LP1d (1^{er} jour après transfert des moutons en LP) (adapté de Hazlerigg *et al.*, 2004).

message mélatoninergique) par la PT. Les variations de phase auraient pour conséquences la formation de peu (LP) ou de nombreux (SP) dimères PER1/CRY1 (modèle "phase", voir [figure 37](#)). La conséquence d'une variation de la quantité de dimères serait une inhibition plus ou moins durable de la transcription des gènes positivement régulés par CLOCK/BMAL1 et, de ce fait, négativement régulés par PER1/CRY1. Dans le cas des hamsters sibérien et syrien, nous avons vu que l'amplitude des niveaux d'ARNm de *Per1* et aussi de PER1 (montré seulement chez le hamster sibérien) est fortement réduite en SP (ARNm : Messenger *et al.*, 1999, 2000, Johnston *et al.*, 2005, protéine : Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000). Cette expression est même arythmique chez le hamster sibérien. Dans ces cas, ce n'est plus la phase qui serait primordiale mais les quantités de protéines produites (modèle "amplitude").

Nous avons cherché si ce modèle de coïncidence interne appliqué à la PT peut être généralisé à une autre espèce de rongeur.

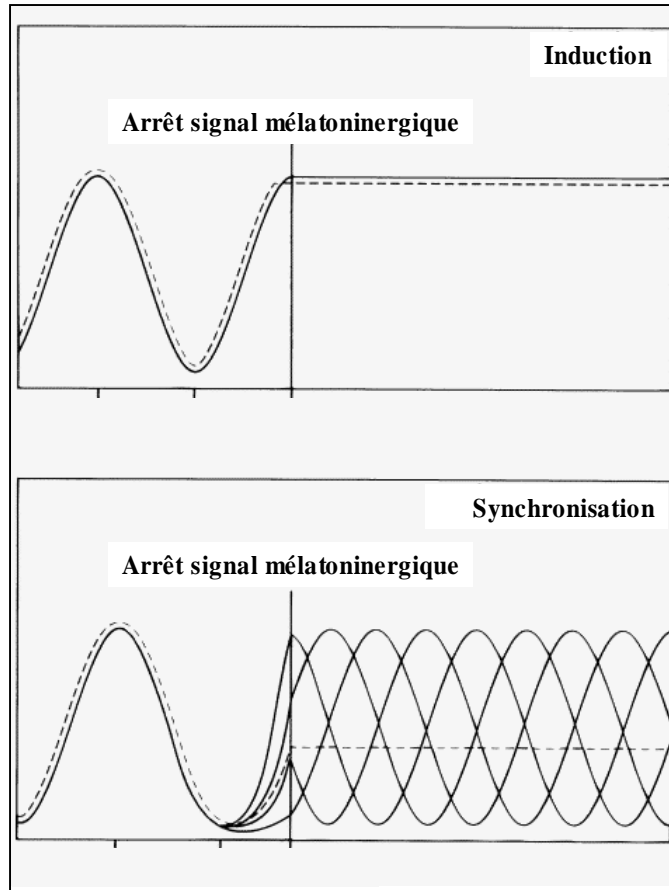


Figure 36 : Modèle hypothétique de l'inhibition de rythmes apparents d'expression circadienne des gènes dans la *Pars tubercalis*.

Les mécanismes proposés montrent, en réponse à l'arrêt du signal mélatoninergique, soit une perte de l'induction de la rythmicité (**en haut**, modèle induction) soit une perte de la synchronisation des rythmes préexistants au niveau cellulaire (**en bas**, modèle synchronisation). Une cellule est représentée par les lignes continues et le tissu entier par la ligne pointillée.

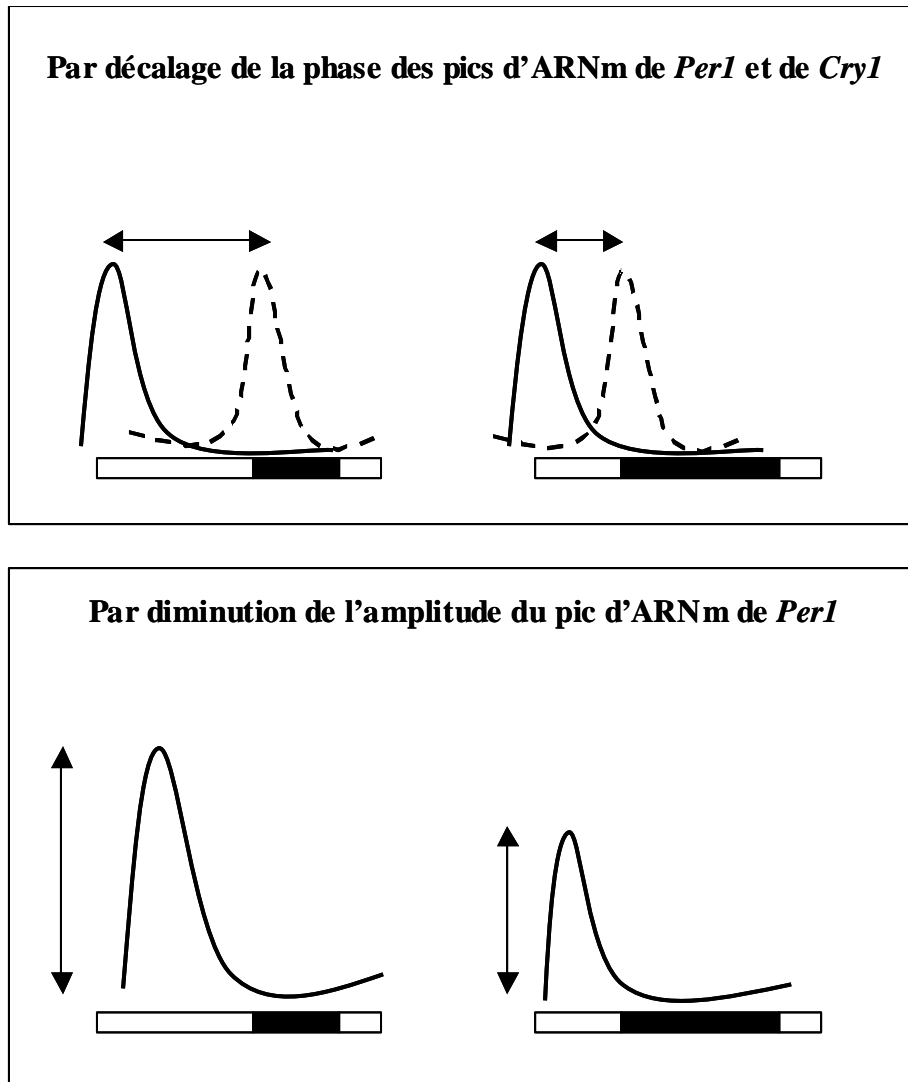


Figure 37 : Représentation des modèles permettant le décodage du signal mélatoninergique dans la Pars tuberalis (modifié d'après Lincoln et al., 2003a).

En haut, chez le mouton, le décodage de signal repose sur la relation de phase entre les pics d'ARNm de *Per1* (ligne continue) et de *Cry1* (ligne hachurée) en fonction de la photopériode. Ceci permettrait la formation de peu ou beaucoup de dimères PER1/CRY1, codant ainsi une physiologie de type estivale ou hivernale. **En bas**, chez les hamsters sibérien et syrien, le modèle repose sur la quantité d'ARNm de *Per1* (ligne continue) produite. Ceci aurait pour conséquence une variation des quantités de PER1 produites, codant ainsi une physiologie adaptée.

2.5. PHOTOPERIODE REFRACTAIRE.

Lorsque les hamsters syriens sont placés pendant une période longue en SP (environ 8 semaines), ils présentent une décroissance de la masse testiculaire induite par la SP et, si cette période est prolongée (environ 24 semaines), une réaugmentation de cette masse testiculaire alors que la photopériode extérieure est toujours de type SP (voir [paragraphe A.2.2.1.2.](#) et [figure 29](#)). Comment l'organisme devient-il insensible à la photopériode environnante? Le message mélatoninergique reste lui aussi de type SP et ne semble donc pas participer à la formation de l'état photoréfractaire (Rollag *et al.*, 1980 ; Bockers *et al.* 1997, Kuhlmann *et al.* 2003). Pour le vérifier, Bittman (1978) a injecté de la mélatonine quotidiennement et pendant 7 semaines, à des hamsters syriens sexuellement inactifs. Malgré la présence de ces injections, les animaux retrouvent un état physiologique de type LP. Cette expérience met bien en évidence le fait que les organes, tissus cibles deviennent insensibles à la mélatonine. Cette insensibilité à la mélatonine a été plus récemment confirmée dans plusieurs structures cérébrales, chez le hamster sibérien (Freeman & Zucker, 2001). La comparaison entre les états LP, SP et les états réfractaires (SP-R pour les rongeurs et LP-R pour le mouton) a apporté des arguments... D'après la [figure 38](#), aussi bien chez les reproducteurs de jours longs que ceux de jours courts, on peut remarquer qu'en photopériode réfractaire, (1) l'activité sexuelle (mesurée par la taille des testicules) est restaurée, (2) d'un point de vue hormonal, la mélatonine reste liée à la valeur de la photopériode contrairement à la PRL dont les niveaux augmentent (animaux de jours longs) ou diminuent (animaux de jours courts) à nouveau, (3) l'expression journalière des gènes horloges dans la PT n'est pas affectée contrairement à celle de α -*Gsu* et peut-être de β -*Tsh*, (4) l'expression des gènes horloges n'est pas affectée dans les SCN sauf pour le gène *Bmal1*, et (5) l'expression de gènes horloges en périphérie (cœur et les poumons) chez les rongeurs redevient de type LP (Bockers *et al.*, 1997 ; Carr *et al.*, 2003 ; Johnston *et al.*, 2003 ; Lincoln *et al.*, 2005). Ainsi, en terme d'expression des gènes horloges, contrairement aux SCN, à la glande pinéale et à la PT, les organes périphériques (montré pour le cœur et les poumons) semblent présenter, en période réfractaire, une activité différente permettant certainement de retrouver une physiologie de type LP (rongeurs) ou SP (mouton).

Si l'on peut comparer les données entre reproducteurs de jours longs et ceux de jours courts, les modalités d'intégration de la période réfractaire par la PT apparaissent similaires : en effet,

les gènes horloges ont leur expression inchangée alors que l'activité transcriptionnelle du gène α -*Gsu* et peut-être même de β -*Tsh*, pourraient être l'élément déterminant de la reprise de la stimulation par la PT de la libération de PRL par la *Pars distalis*. En effet, les variations d'expression de l' α -*Gsu* en état photoréfractaire, précèdent celles de la PRL (Bockers *et al.* 1997). D'après les données sur l'expression des gènes horloges résumées [figure 38](#), les SCN n'interviendraient pas dans l'apparition des états photoréfractaires. Il est tout de même intéressant de noter que chez les hamsters syriens de souche *tau*, mutation qui, rappelons le, provoque une diminution de la période circadienne, l'apparition de la régression testiculaire en SP et de sa réaugmentation (SP-R) apparaissent plus rapidement que chez les WT (Loudon *et al.*, 1998, mesures par calcul de l'indice testiculaire, Vitaterna & Turek, 1993). En revanche, en ne considérant plus une journée comme étant égale à 24h mais à 20h chez les mutants *tau*, et à 24h chez les WT, c'est à dire en fonction des jours circadiens et non plus astronomiques, l'apparition des physiologies de type SP et SP-R surviennent aux mêmes moments chez les deux souches (Loudon *et al.*, 1998). Ainsi, puisque le nombre de "jours circadiens" semble être important, il est probable que les SCN jouent un rôle dans la mise en œuvre de ces physiologies annuelles...

Ce rôle éventuel de l'horloge circadienne dans la physiologie réfractaire constituera également une part de mes recherches.

Une analyse par *microarray*, confirmée par RT-PCR, de l'hypothalamus de hamsters sibériens en LP, SP ou SP-R a permis de montrer que des gènes de la famille des TBP ("T4 binding protein") présentent une expression identique en LP et SP mais différent en SP-R (Prendergast *et al.*, 2002). De plus, une hypothyroïdie provoquée provoque une recrudescence testiculaire plus précoce (Prendergast *et al.*, 2002). Ainsi, en terme d'activité sexuelle, une diminution des quantités de T₄ circulante qui est sans effet en LP et n'empêche pas l'apparition de la physiologie de type SP, permet l'apparition de l'état réfractaire de façon plus précoce. Ces données, obtenues chez le hamster sibérien, confirment la levée de l'état photoréfractaire chez le mouton par thyroïdectomie (Follett & Potts, 1990). Ce modèle de contrôle par la T₄ de la durée nécessaire pour voir apparaître l'état réfractaire pourrait se généraliser à toutes les espèces à physiologie photopériodique. Les mécanismes de régulation photopériodique des enzymes intervenant dans la conversion T₄ à T₃ (entre LP et SP, voir [chapitre A.2.3.3.2.](#)), et ceux, intervenant dans la régulation des TBP en SP/LP-R, demeurent inconnus.

Reproducteurs de jours longs (SP-R)

Valeur mesurée	Localisation	Profil obtenu en période R, type	Espèce	Ref.
Mélatonine	Circulante	SP	toutes	
Testicules		LP	toutes	
PRL	Circulante	LP	h. syrien	(3)
	PD (HIS)		h. sibérien, syrien	(1, 3)
	PD (ICC)		h. sibérien	(3)
	PT de SP-R avec cellules GH ₃ (avec rapporteur PRL-Luc)		h. syrien	(3)
α -GSU	PT (HIS, ICC)	LP	h. sibérien	(1)
β -TSH		SP		(1)
<i>Per1</i>	PT	SP	h. syrien	(3)
	SCN	SP	h. sibérien, syrien	(2,3)
	Poumons	LP	h. syrien	(2)
	Coeur			(2)
<i>Per2, Cry2</i>	SCN	SP	h. syrien	(2)
<i>Dbp</i>	Coeur	LP	h. syrien	(2)

Reproducteurs de jours courts (LP-R) : le mouton (4)

Valeur mesurée	Localisation	Profil obtenu en période R, type
Mélatonine	Circulante	LP
Testicules		SP
PRL	Circulante	SP
Act. locomotrice		
<i>Per1, Per2, Rev-erbα, Cry1/2</i>	SCN	LP
	PT	LP
<i>Bmall</i>	SCN	Ni LP, ni SP
	PT	LP
α -GSU	PT	Ni LP, ni SP
β -TSH	PT	Réduit p/à LP

Figure 38 : Mesures de différents critères en photopériode réfractaire et comparaison avec les états LP et SP chez des reproducteurs de jours longs et courts.

En haut pour les reproducteurs de jours longs et en bas pour le mouton, reproducteur de jours courts. h, hamster; PD, pars distalis; r, réfractaire.

(1) Bockers *et al.*, 1997; (2) Carr *et al.*, 2003 ; (3) Johnston *et al.*, 2003 ; (4) Lincoln *et al.*, 2005.

2.6. UNE HORLOGE SAISONNIERE.

Nous avons évoqué précédemment que la reproduction, la masse corporelle ou encore la qualité du pelage présentent des variations saisonnières. De nombreux protocoles ont été réalisés dans le but de déterminer si ces rythmes sont uniquement le reflet des variations photopériodiques ou, sont dus à la présence d'une "horloge endogène circannuelle" synchronisée à un an par la photopériode.

2.6.1. Une contrainte majeure.

Nous avons vu au [chapitre A.1.1.](#) que l'une des propriétés d'une horloge, est sa capacité à fonctionner de façon auto-entretenu. Le problème dans le cas d'une horloge circannuelle, donc de période proche de 365 jours, est la durée d'expérimentation. En effet, une étude portant sur un critère physiologique et pendant une période d'environ un an, peut mettre en évidence une variation de ce critère mais cette variation ne peut pas être rigoureusement qualifiée d'endogène. Seules les variations de ce critère, répétées à l'identique sur plusieurs périodes, permettent de conclure quant au caractère endogène de cette adaptation, donc de la présence d'une horloge circannuelle. Ainsi, le problème des études de mise en évidence de la présence d'une horloge circannuelle nécessitant une durée d'expérimentation minimale longue, est la durée de vie de l'espèce étudiée. Par analogie avec le système circadien, rappelons que les neurones des SCN, mis en culture, peuvent continuer à présenter des variations d'activité électrique pendant au moins 42 jours (Welsh *et al.*, 1995 ; Honma *et al.*, 1998a), soit environ 42 périodes. Une telle répétition est bien entendu impossible et de nombreuses études ont été réalisées au mieux sur une période de 2 ou 3 ans.

2.6.2. Mises en évidence physiologiques et caractéristiques.

Au cours des études, les animaux ne sont plus soumis aux variations saisonnières de l'environnement afin de prouver l'existence de l'horloge circannuelle. Différentes espèces d'écureuils terrestres (*Spermophilus lateralis*, *tridecemlineatus*, *beecheyi*...), de furets (*Mustela putorius putorius*, *putorius furo*) ou encore la chauve souris rousse (*Antrozous pallidus*), et le hamster d'Europe, présentent des physiologies dépendantes du moment de l'année bien qu'aucune indication de temps saisonnier ne puisse être perçue par les animaux. Dans ces différents exemples, les études ont été effectuées à photopériode et température

constantes, jusqu'à 6 ans dans le cas de l'écureuil terrestre de Californie (*S. beecheyi*). Les critères physiologiques choisis étaient, en fonction des études, la taille des testicules, la masse corporelle et/ou l'hibernation (dans l'ordre de citation des espèces ci-dessus : Pengelley & Asmundson, 1969 ; Mrosovsky *et al.*, 1971 ; Davis & Swade, 1983 ; Boissin-Agasse *et al.*, 1985 ; Baum & Goldfoot, 1974 ; Beasley *et al.*, 1984 ; Canguilhem *et al.*, 1977). Ainsi, ces animaux présentent des variations annuelles physiologiques en l'absence de variations annuelles de l'environnement. Cela met en évidence deux propriétés d'une horloge (cf [chapitre A.1.1.](#)) : sa capacité à générer une rythmicité de façon auto-entretenu et à contrôler des rythmes apparents de fonctions physiologiques et comportementales.

Une autre caractéristique d'une horloge est sa capacité à être entraînée. Dans le cas de l'horloge saisonnière, une comparaison entre la durée des périodes mesurées en conditions environnementales constantes et en conditions naturelles, apporte un élément de réponse. Par exemple, dans le cas de l'écureuil terrestre doré (*S. lateralis*) (Pengelley *et al.*, 1976), l'augmentation de masse corporelle et les moments d'hibernation apparaissent de plus en plus tôt au fil des ans, les animaux étant placés en conditions de lumière et de température constantes, LD12:12 et 0 ou 21°C. La période endogène circannuelle de ces rythmes est donc inférieure à 365 jours mais, si les animaux sont placés en photopériode naturelle, ces événements conservent au cours du temps une période d'un an. Une démonstration de l'entraînement, peut-être plus percutante, est la capacité des animaux (donc de l'horloge circannuelle) à se resynchroniser après un changement de saison. Pour ce faire, Davis & Finnie (1975) ont transféré des marmottes (*Marmota monax*) de l'hémisphère nord (Pennsylvanie, USA) à l'hémisphère sud (Sydney, Australie). Ces marmottes étaient maintenues en conditions environnementales naturelles, avant et après transfert. En terme de rythme de masse corporelle, deux ans ont été nécessaires pour que les marmottes présentent l'acrophase de ce rythme, en phase avec le printemps de l'hémisphère sud.

On peut penser que les rythmes circannuels ne seraient pas endogènes mais s'amortiraient au fil des années jusqu'à ne plus exister. Comme la majeure partie des études n'est réalisée que sur quelques années, donc quelques périodes, un amortissement pourrait expliquer les résultats obtenus. Mais, chez l'écureuil terrestre doré, les rythmes annuels de masse corporelle et d'hibernation persistent même si les animaux sont maintenus depuis leur naissance en environnement constant (Pengelley & Asmundson, 1970). Une expérience plus récente rapporte des enregistrements du rythme circannuel d'hibernation chez l'écureuil de Sibérie

(*Tamias sibiricus*) placé en photopériode constante DD et à 5°C pendant une période de dix ans (Kondo *et al.*, 2006). 75% des animaux présentent un cycle circannuel d'hibernation avec une période individuelle stable au fil des années. Cette période circannuelle est cependant très différente d'un animal à l'autre (de 157 jours minimum à 391 jours maximum avec une moyenne de 313 jours pour l'ensemble des animaux). Ainsi, au moins chez les écureuils terrestres dorés et de Sibérie, les rythmes observés sont innés et ne peuvent refléter un amortissement d'une rythmicité induite par le monde extérieur. Chez le hamster d'Europe, il est également important de noter que sa sensibilité à la photopériode environnante varie au cours de l'année, ce qui doit certainement refléter son aptitude à exprimer une horloge circannuelle contrairement au hamster syrien qui, ne présente pas ce rythme de sensibilité. En effet, le hamster d'Europe présente une phase de sensibilité à la fois à la SP (de mi-mai à juillet/août) et à la LP (de mi-novembre à mars/avril) (Saboureau *et al.*, 1999 ; Monecke & Wollnik, 2004).

2.6.3. Quelques limites...

Chez de nombreuses espèces, la présence d'une horloge circannuelle a donc été démontrée, en mettant en évidence la persistance d'un rythme physiologique apparent. Cependant, cette démonstration ne peut se faire que dans des conditions bien précises. Chez le furet, ce même rythme est marqué en conditions LD et LL mais disparaît en DD (Boissin-Agasse *et al.*, 1985, 1986). De plus, les conditions lumineuses ne sont pas les seules à pouvoir modifier l'expression de l'horloge circannuelle. En effet, il a été mis en évidence, et notamment chez l'écureuil terrestre doré, que des variations de température, à photopériode constante, peuvent modifier la période circannuelle de l'apparition de l'hibernation (Mrosovsky, 1980, 1990).

2.6.4. Localisation de cette horloge.

La localisation anatomique de l'horloge circannuelle n'a pas encore été déterminée. Comme les SCN et la glande pinéale jouent un rôle tant au niveau circadien que saisonnier, la question s'est posée de savoir si ces deux structures intervenaient dans l'établissement des rythmes circannuels. Ainsi, notre laboratoire a montré qu'en LP, une pinéalectomie n'inhibe pas les variations circannuelles de l'état reproductif des hamsters d'Europe (Masson-Pévet *et al.*, 1994a). En ce qui concerne l'implication de l'horloge circadienne, les données concernent essentiellement l'écureuil terrestre doré, placé en photopériode constante. Une lésion des SCN

n'inhibe pas le rythme circannuel de la masse corporelle d'animaux placés en condition de température estivale, mais inhibe ce rythme pour 50% des animaux si la température environnante est de type hivernal (Zucker *et al.*, 1983 ; Dark *et al.*, 1985 ; Ruby *et al.*, 1998). En revanche, les périodes des rythmes d'hibernation, de masse corporelle et de masse testiculaire, sont toutes perturbées après lésion des SCN (Dark *et al.*, 1990 ; Lee & Zucker, 1991 ; Ruby *et al.*, 1998). De plus, la modification des périodes n'est pas identique entre tous les rythmes mesurés. En effet, les rythmes d'hibernation et de masse corporelle ne sont plus synchronisés entre eux après lésion (Ruby *et al.*, 1998).

2.6.5. Un rôle pour la PT ?

Chez le mouton, la présence d'une horloge circannuelle est également fortement suspectée. Le suivi pendant 6 ans des taux de PRL, de brebis placées en SP constante, montre un rythme circannuel (Karsch *et al.*, 1989). Des moutons DHP peuvent également présenter des variations circannuelles de PRL alors que le message mélatoninergique est constant (Lincoln & Clarke, 2000 ; Lincoln *et al.*, 2003b). L'une des hypothèses pour expliquer ces phénomènes est qu'une horloge circannuelle est présente dans la PT, et de plus, ne serait pas dirigée par les gènes horloges.

2.6.6. Conclusions.

Ainsi, une rythmicité physiologique saisonnière endogène a été mise en évidence chez de nombreux mammifères. Cependant, l'interprétation des résultats n'est pas aisée du fait de la présence d'une grande variabilité de la période circannuelle pour un même critère physiologique entre espèces mais aussi entre différents individus d'une même espèce. De plus, dans la majeure partie des cas, cette horloge circannuelle n'est effective que dans des conditions très particulières, notamment d'éclairement et de température. Les structures anatomiques abritant cette horloge circannuelle n'étant toujours pas identifiées, l'implication des SCN ou de la PT reste peu démontrée. Au final, les voies probables d'entrée (photopériode et température) et celles de sortie (hibernation, masses testiculaire et corporelle) de cette horloge circannuelle sont relativement bien connues mais l'horloge en elle-même, reste au demeurant à découvrir tant au niveau anatomique que fonctionnel.

B. Objectifs

Lorsque j'ai débuté mes recherches doctorales, de nombreux travaux permettaient de préciser les boucles de régulations transcriptionnelles et traductionnelles des gènes horloges à la base des oscillations circadiennes de l'horloge centrale. De plus, la synchronisation de ces oscillations endogènes à 24h par le cycle jour/nuit était vérifiée.

Parallèlement, des données de la littérature signalaient des variations photopériodiques de plusieurs indicateurs du fonctionnement journaliers des SCN. Par exemples, les durées de pic d'activité électrique des cellules des SCN et aussi la durée de sensibilité à la lumière des SCN, en terme d'expression de *c-fos*, dépendent de la photopériode.

Aussi, nous avons fait l'hypothèse que l'horloge circadienne n'est pas seulement synchronisée par l'alternance jour/nuit, mais qu'elle est également profondément affectée, jusque dans son cœur moléculaire, par les durées relatives du jour et de la nuit. Nous avons donc établi les profils nycthémeraux des produits des gènes horloges au sein des SCN chez des animaux maintenus dans différentes photopériodes (**chapitre D.1.**). Chez le hamster syrien, nous avons montré que l'expression des gènes horloges dépend des conditions photopériodiques. Confirmée chez le hamster d'Europe, cette première étude montre que **les SCN ont donc un fonctionnement journalier dépendant des saisons.**

Le fait que l'expression des gènes horloges, le cœur des mécanismes moléculaires, est dépendante de la photopériode pose la problème de la nature de cet effet. Nos résultats sont dus soit à un effet passif de la photopériode soit à la construction d'un message photopériodique par les SCN. Nos résultats ont contribué à l'essor du concept des SCN comme "l'horloge des quatre saisons", c'est à dire que les SCN élaborent des messages journaliers mais également saisonniers. Pour valider cette hypothèse, nous avons vérifié que les variations photopériodiques d'expressions géniques ne sont pas des adaptations passives des SCN vis à vis des conditions lumineuses mais reflètent bien la capacité des SCN à construire des messages différents en fonctions des conditions photopériodiques. Nous avons donc suivi chez des hamsters syriens transférés de LP à SP, les modifications de l'expression des gènes horloges mais également, parallèlement, de gènes contrôlés par l'horloge, c'est à dire de gènes "de sortie" de l'horloge. Le décours temporel de l'apparition de ces modifications montrent que les SCN intègrent progressivement un changement de photopériode et construisent à terme un nouveau message photopériodique. Etendue à la condition physiologique photoréfractaire, cette étude nous permet de proposer un rôle primordial pour le gène *Clock* dans **la construction de messages saisonniers par les SCN** (**chapitre D.2.**).

Nous nous sommes alors intéressés à la distribution, par les SCN ou en aval via la mélatonine, des messages photopériodiques élaborés par l'horloge.

Plusieurs facteurs dont le TGF α ont été évoqués comme étant secrétés par les SCN et intervenant dans le contrôle circadien de l'activité locomotrice. Or le rythme d'activité locomotrice est très dépendant des conditions photopériodiques, en particulier chez le hamster d'Europe. Dans le but d'établir à terme une corrélation entre les variations photopériodiques du niveau d'expression du TGF α et de l'activité locomotrice, nous avons d'abord voulu vérifier que le TGF α est bien impliqué dans le contrôle de cette activité. Aussi, nous avons vérifié si l'expression du TGF α dans les SCN varie suivant le caractère diurne ou nocturne ce qui constitue la troisième partie de ma thèse (**chapitre D.3.**).

Après avoir démontré que les SCN sont à la base de la construction de messages photopériodiques, nous avons voulu déterminer comment ces messages peuvent être décodés par leurs cibles. La mélatonine est le principal médiateur hormonal des informations rythmiques élaborées par les SCN. Une des cibles de la mélatonine les plus étudiées est la *Pars tuberalis* de l'adénohypophyse dont les cellules expriment les récepteurs à la mélatonine et interviennent dans le contrôle saisonnier de la synthèse de prolactine, hormone impliquée dans diverses adaptations saisonnières comme les variations de la qualité du pelage.

Nous avons donc vérifié que la *Pars tuberalis* est sensible, en terme d'expressions des gènes horloges, aux conditions photopériodiques. Nous avons également démontré que la mélatonine elle-même contrôle l'expression des gènes horloges dans la *Pars tuberalis* (**chapitre D.4.**). Ainsi nous montrons que **les SCN, par l'intermédiaire de la mélatonine, contrôlent les variations saisonnières d'expression des gènes horloges dans la *Pars tuberalis*.**

C. Matériels et méthodes

1. Animaux et prélèvements.

L'ensemble des données décrites ci-dessous est présenté [figure 39](#).

1.1. CONDITIONS D'ELEVAGE.

Quelle que soit l'espèce de rongeurs utilisée, les individus ont été maintenus dans des conditions *ad libitum* d'accès à l'eau et à la nourriture. A l'intérieur des pièces en photopériode contrôlée, une lumière rouge (inférieure à 1 lux) reste allumée en permanence pour faciliter les manipulations pendant les phases nocturnes.

Les hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*) mâles provenant soit de notre propre élevage, soit de Harlan France (Ganat, France), ont été maintenus en photopériode longue (LP), dans des conditions LP14:10 (14h de lumière, 10h de nuit) ou LP16:8 en fonction des expériences. Les photopériodes courtes (SP) associées sont respectivement SP10:14 et SP8:16. Lors des prélèvements, 4 ou 5 animaux ont été pris par point horaire, ils étaient donc regroupés dans une même cage. Les animaux restent en LD8:16 pendant un temps variable, indiqué sur la figure 39 par 4d (4 jours), 21d (21 jours), acc (acclimatés, soit 8 semaines), 26s (26 semaines, et SP-R, photopériode réfractaire).

Les hamsters européens (*Cricetus cricetus*) mâles et femelles proviennent tous de notre élevage. Ils sont maintenus en cage individuelle contenant de la paille dans un enclos couvert. Ces hamsters sont donc protégés des intempéries mais soumis aux conditions naturelles d'éclairage et de température. Les animaux sont prélevés en été (4 animaux par point horaire, photopériode longue naturelle, environ LP16:8) ou en hiver (6 animaux par point horaire, photopériode courte naturelle, environ SP8:16), toutes les 3 heures pendant 24 heures. Certains animaux en LP16:8 ont été injectés avec une solution de mélatonine (1mg/kg) ou saline, en début de nuit et sont sacrifiés 2 ou 4 heures après injection, à raison de 4 animaux par condition d'injection et par point horaire.

Les souris (*Mus musculus*) mâles provenant de Charles River (Lyon, France) et les rats roussards (*Arvicanthis ansorgei*) femelles (expériences 1 et 2) et mâles (expériences 3 et 4) provenant de notre propre élevage, ont tous été maintenus en photopériode LD12:12. Pour les expériences 1 et 2, le protocole de prélèvement est identique : les animaux (souris et rats) sont

Chapitre	Espèce	Conditions d'éclairagements et injections	Prélèvements	Nombre d'animaux par point, nombre d'animaux au total	Structure étudiée	Méthodes d'analyse	Statistiques et linéarisation des profils							
D.1.1.	Hamster syrien (<i>Mesocricetus auratus</i>)	LP14:10 SP10:14	12 points, toutes les 2h à partir de ZT1.	4 / point, 48 total par condition	SCN	HIS, quantification avec le système Biocom	Analyse de la variance et linéarisation par une courbe à un (deux) pic logistique							
								D.1.2.	Hamster européen (<i>Cricetus cricetus</i>)	LP16:8 naturelle SP8:16 naturelle LP16:8 naturelle, inj. mel/sal à ExtT21	8 points, toutes les 3h à partir de ExtT4 (SP) et ExtT5 (LP) 2h et 4h post-inj.	4 / point, 32 total (LP) 6 / point, 48 total (SP) 4 / point, 16 total (LPinj)	SCN	HIS, quantification avec Image J. RIA, dosage mélatonine
D.2.1.	Hamster syrien	LP16:8acc SP8:16, 4d SP8:16, 21d SP8:16acc SP8:16, 26s (SP-R)	6 points, toutes les 4h à partir de ZT2	5 / point, 30 total par condition	SCN Glande pinéale	HIS, quantification avec Image J.								
D.2.2.	Mouton de Soay (<i>Ovis aries</i>)	LP16:8 et LL le jour des prélèvements. Injection sham ou mel, 3h avant prélèvement	6 points, toutes les 4h à partir de ZT4.	4 / point, 24 total par condition	SCN	HIS, quantification avec Image J. RIA, dosage mélatonine et prolactine	Analyse de la variance							
								D.4.2.		<i>Pars tuberalis</i>				
D.3.	I Idem ci-avant Rat roussard	Exp1 : LD12:12 LD12:12 et DD 2 jours avant prélèvement Exp2 : Idem ci-avant Exp3 et 4 : Idem ci-avant, plus créneau lumineux (Lum) de 1 (à CT6) ou 6 heures (à CT2).	6 points, toutes les 4h à partir de ZT(CT)0.	5 / point, 30 total par condition (souris) 5 / point, 30 total par condition (rat)	SCN	HIS, quantification avec Image J.	Analyse de la variance et linéarisation par analyse du cosinor							
								Idem ci-avant	3. CT7 ; CT7+Lum1 ; CT8 ; CT8+Lum1. 4. ZT8 ; ZT16 ; CT8 ; CT8+Lum6					
										4 / point, 32 total				

maintenus soit en LD12:12 soit pendant 2 jours en DD et 4 ou 5 animaux sont sacrifiés toutes les 4 heures par condition d'éclairage. Dans les expériences 3 et 4, seuls des rats roussards ont été utilisés. Pour ces expériences, une première partie des animaux est restée en LD12:12, une deuxième en DD pendant 2 jours et enfin, une troisième, en DD pendant 2 jours avec une exposition à la lumière pendant le jour subjectif. Les heures de prélèvement, les conditions ("Lum" pour créneau lumineux) et les durées d'exposition lumineuse sont indiquées dans la figure 39.

Les moutons de Soay (*Ovis aries*) femelles proviennent du laboratoire du Dr Gérard Lincoln (Edinburgh, Royaume-Uni) et sont placés en LP16:8 dans des boxes individuels. La nourriture leur est donnée à raison de 500g par animal et par jour (Vitagrass, Cumbria, UK). L'eau et la paille sont fournies *ad libitum*. Le jour des sacrifices, les animaux sont placés en lumière constante (LL pour light-light) afin d'inhiber la production endogène de mélatonine. Les animaux reçoivent un implant de mélatonine (Regulin; CEVA Animal Health, Chesham, Bucks, UK), pour la moitié d'entre eux, 3 heures avant prélèvement.

1.2. PRELEVEMENTS.

Les cerveaux des rongeurs qui feront l'objet d'une **hybridation *in situ*** sont prélevés après décapitation et immédiatement congelés à -30°C dans de l'isopentane refroidi par des vapeurs d'azote liquide. Les horaires de prélèvements ainsi que le nombre d'animaux prélevés par point dépendent de l'expérience. Ainsi, les prélèvements ont été effectués toutes les 2, 3 ou 4 heures sur un cycle de 24 heures et le nombre d'animaux par point varie entre 4 et 6. Dans le cas des moutons de Soay, les animaux ont été tués par une injection de pentobarbital. Dans les dix minutes suivant l'injection, l'hypothalamus et l'hypophyse (en préservant la tige hypophysaire) sont prélevés et congelés de manière identique à celle des tissus de rongeurs. Les cerveaux sont ensuite débités au cryostat en coupes de 14 ou 20 μm (en fonction de la structure étudiée et de l'espèce utilisée) et placés sur des lames gélatinées (1% gélatine, 0.4% Alun de chrome) et stériles.

Dans certaines expériences, l'effet de la mélatonine exogène a été testé sur l'expression des gènes horloges. Des injections sous-cutanées de mélatonine ont donc été réalisées. Mais la méthodologie utilisée est différente en fonction de l'espèce. Dans le cas des hamsters d'Europe, la mélatonine, diluée dans du Ringer-Alcool (5% éthanol dans Ringer), est injectée

en intra-péritonéal à l'aide d'une seringue à raison de 1mg/kg de mélatonine. Dans le cas des moutons de Soay, G. Lincoln et H. Andersson (de l'institut de recherche médical "The Queen", Edimbourg, UK) ont placé des implants sous-cutanés contenant de la mélatonine (Regulin, CEVA Animal Health, Chesham, Bucks, UK) dans une des pattes arrières. Les groupes contrôles ont reçu soit une injection saline soit un implant ne contenant pas de mélatonine.

Pour les mesures des niveaux hormonaux sanguins (mélatonine et prolactine) par **dosage radioimmunologique**, le sang est récupéré dans des tubes héparinés. Les tubes sont ensuite placés à 4°C jusqu'à centrifugation (4°C, 15min à 2000rpm) ce qui permet d'isoler le sérum alors stocké à -20°C. Les prélèvements de sang ont été effectués après décapitation pour les hamsters et, par aspiration au niveau de la veine jugulaire, à l'aide d'une seringue, pour les moutons. Dans certains cas, les quantités de mélatonine sont mesurées directement dans une glande pinéale. Ces dernières ont été prélevées, après décapitation, et immédiatement congelées par des vapeurs d'azote liquide.

2. Hybridation *in situ* radioactive.

2.1. TECHNIQUE 1.

2.1.1. Clonage et synthèse des sondes.

Les ribosondes sont obtenues à partir de la transcription d'ADN complémentaire de souris (mADNc, m pour "mouse") ou de rat (rADNc). Des stocks à -80°C de bactéries *Escherichia coli* XL10 transformées par des plasmides recombinants détenant la majorité des gènes d'intérêt, sont disponibles au laboratoire. A partir de ces colonies, j'ai pu développer mes propres outils. La synthèse des sondes se déroule en deux étapes : extraction et linéarisation des plasmides puis transcription de la zone d'intérêt. Ces étapes sont semblables pour chaque gène et sont détaillées plus particulièrement pour l'obtention des sondes antisens (AS) et sens (S) de *rPer1*. De plus, les vecteurs et enzymes spécifiques (restriction et ARN polymérase) de quelques inserts sont indiqués à titre indicatif, ainsi que leurs origines, [figure 40](#).

Dans le cas des gènes *rAvp* et *rRev-erba*, nous avons effectué une amplification par PCR ("polymerase chain reaction") à partir d'ADNc d'hypothalamus et des oligonucléotides 5'-CCTGCTGGCCCTCACCTCT-3' et 5'-GGGGGCGATGGCTCAGTAG-3' pour *rAvp* (accès sous GenBank : M25646) et 5'-CCCCGCACCCACCTCAG-3' et 5'-AGCCCCCAGCAGCGTCTCC-3' pour *rRev-erba*. (accès sous GenBank : NM_145775). La taille des produits obtenus est vérifiée sur gel d'agarose (agarose 1%, 1 μl bromure d'éthidium -BET- 10mg/ml). Ils sont ensuite clonés en suivant le protocole pCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene). Les plasmides récupérés sont séquencés (AGOWA sequencing services, Germany) afin de vérifier l'orientation et l'identité du fragment d'ADNc cloné.

◆ *Obtention des plasmides linéarisés.*

Une partie du gène d'intérêt est inséré au niveau du site de clonage multiple du plasmide qui, dans le cas de *rPer1*, est un pGEM-T (Promega). La mise en culture d'une partie du stock de bactéries, prélevée avec un cure dents à proximité d'un bec Bunsen, s'effectue en présence d'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sous agitation à 37°C pendant 16h dans 100ml de milieu LB (NaCl 0.17M ; 10g tryptone ; 5g d'extraits de levure ; qsp 1l H₂O autoclavée ; pH7). Les bactéries

XL10 étant sensibles à cet antibiotique, elles ne peuvent donc pas se multiplier en sa présence.

Mais, comme le plasmide pGEM-T possède un gène de résistance à l'ampicilline, les bactéries qui le contiennent, peuvent dégrader l'ampicilline et se diviser normalement et donc dupliquer le plasmide.

L'extraction des plasmides est réalisée suivant le protocole QIAfilter (Qiagen Plasmid Purification Handbook, 1997). Les plasmides extraits sont ensuite dilués pour atteindre une concentration finale de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (déterminée avec un spectrophotomètre Uvikon 922, Bio-Tek Kontron). Ensuite, $20\mu\text{l}$ de plasmide sont linéarisés (37°C ; 1 nuit) par $2\mu\text{l}$ d'une enzyme de restriction spécifique $10\text{U}/\mu\text{l}$ (Sall pour la sonde AS et SphI pour la sonde S, Fermentas), en présence de $2.45\mu\text{l}$ de tampon d'enzyme 10X (Fermentas) contenant de l'albumine de sérum bovin ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) pour favoriser la réaction enzymatique.

Une vérification du bon déroulement de la linéarisation est réalisée par électrophorèse horizontale (80V ; 50mA) sur gel d'agarose (agarose 1% ; 35ml tampon tris borate EDTA 1X ou TBE 1X, Euromedex ; $1\mu\text{l}$ BET $10\text{mg}/\text{ml}$, Fermentas) qui permet de distinguer les plasmides en fonction de leur conformation (circulaire ou linéaire). Pour cela, $1\mu\text{l}$ de tampon de charge 6X (Fermentas) est mélangé à soit $0.5\mu\text{l}$ de produit de linéarisation puis déposé dans un puits du gel, soit $0.5\mu\text{l}$ de plasmide circulaire puis déposé dans un autre puits du même gel. Après $1\text{h}30$ de migration dans le gel en présence d'un tampon salin (500ml TBE 1X ; $4\mu\text{l}$ BET) l'ADN est visualisé sous lumière UV à 254nm . Comme la conformation d'un plasmide linéaire diffère de celle d'un plasmide circulaire, la distance parcourue par le front de migration doit être différente.

L'ADN linéarisé est ensuite purifié par une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Ainsi, l'ADN est mis en présence de $25\mu\text{l}$ de phénol / chloroforme / Iso-amyl-ol (v/v/v : 25/24/1) puis après centrifugation (13000g ; 20min ; 4°C), la phase aqueuse contenant l'ADN, est prélevée (environ $30\mu\text{l}$) en évitant de prélever les débris situés à l'interface des phases. Sa précipitation est alors effectuée en y ajoutant un mélange de $15\mu\text{l}$ d'acétate d'ammonium 5M et de $112\mu\text{l}$ d'éthanol 100% et le tout est placé à -20°C pendant 2h, pour favoriser la précipitation, suivie d'une seconde centrifugation, dans les mêmes conditions. Le culot ainsi obtenu est lavé deux fois par de l'éthanol 80% (-20°C) puis centrifugé afin d'éliminer les sels. Le culot est enfin repris dans de l'eau autoclavée pour obtenir une concentration de plasmides linéarisés de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (déterminée par spectrophotométrie).

Gène	Plasmide	Taille insert (pb)	Enzyme de restriction		ARN polymérase		Origine
			AS	S	AS	S	
rPer1	pGEM-T	981	Sal1	Sph1	T7	SP6	Pr. Okamura
rPer2	pGEM-T	760	Nde1	Nco1	T7	SP6	Pr. Okamura
mClock	pCRScript SK(+)	3441	Xho1	Not1	T7	T3	Pr. Takahashi
rAVP	pCRScript SK(+)	472	Not1	BamH1	T7	T3	Lab.
rRev-erbα	pCRScript SK(+)	983	Not1	BamH1	T7	T3	Lab.

Figure 40 : Exemples de plasmides et d'enzymes utilisées pour la réalisation de ribosondes spécifiques.

◆ *Transcription des plasmides linéarisés.*

Les sondes sont obtenues par transcription (37°C ; 1h45, Maxiscript, Ambion) de 1µg de plasmides linéarisés (AS ou S) en présence de 1µl d'UTP 0.25mM, 1µl de chacun des autres désoxyribonucléotides 10mM (ATP, CTP et GTP), 50µCi de ³⁵S-UTP (Amersham), 10U d'ARN polymérase spécifique (T7 pour la sonde AS et SP6 pour la sonde S dans le cas de *rPer1*), 2µl de tampon spécifique à l'enzyme 10X et qsp 20µl H₂O autoclavée. Ensuite, 1µl de ADNase est ajouté au mélange réactionnel pendant 15min pour digérer le plasmide.

Deux étapes de purification sont alors effectuées. La première est effectuée en ajoutant 100µl de phénol / chloroforme / Iso-amyl-ol (v/v/v : 25/24/1), 70µl d'acétate d'ammonium 5M et 30µl d'eau autoclavée, puis une centrifugation (13000g ; 20min ; 4°C) permet de séparer la phase aqueuse contenant les ARN, des protéines et autres contaminants. Ce surnageant (environ 130µl) est repris dans 10µl d'ARNt (3mg/ml, Roche), 325µl d'éthanol 100% (-20°C) et placé à -20°C pendant une nuit, ce qui permet de précipiter les ARN, avant une seconde centrifugation. Les sels ayant précipités avec les ARN sont dissous avec 400µl d'éthanol 80% et ensuite éliminés par centrifugation. Le nouveau culot est repris dans 98µl d'eau autoclavée et 2µl de dithiothréitol (DTT) 1M pour éviter l'oxydation des sondes.

Dans le cas des sondes *mClock*, leur grande taille (3441pb) rend difficile leur entrée dans les cellules. En conséquence, avant l'étape de lavage des sels, on réduit leur taille à environ 250pb par une réaction d'hydrolyse alcaline (50µl d'eau ; 50µl de tampon carbonate de sodium 0.2M pH10 ; 60°C). La durée (d) de cette réaction est calculée théoriquement avec la formule :

$d = [(L_i - L_f) / (0.11 \times L_i \times L_f)]$ avec L_i la longueur initiale de la sonde et L_f sa longueur finale, théoriquement 250pb ; d=34min dans le cas des sondes *mClock*. Cette réaction est neutralisée (8µl d'acide acétique 10% ; 60µl d'acétate d'ammonium 5M ; 375µl d'éthanol 100%).

2.1.2. Hybridation.

Les coupes sur lames sont traitées en 3 étapes successives : la préhybridation qui permet de diminuer le marquage non spécifique, l'hybridation proprement dite entre la sonde et le tissu, et la posthybridation qui permet de rincer les lames pour supprimer les sondes non hybridées. L'ensemble de ces étapes est représenté [figure 41](#).

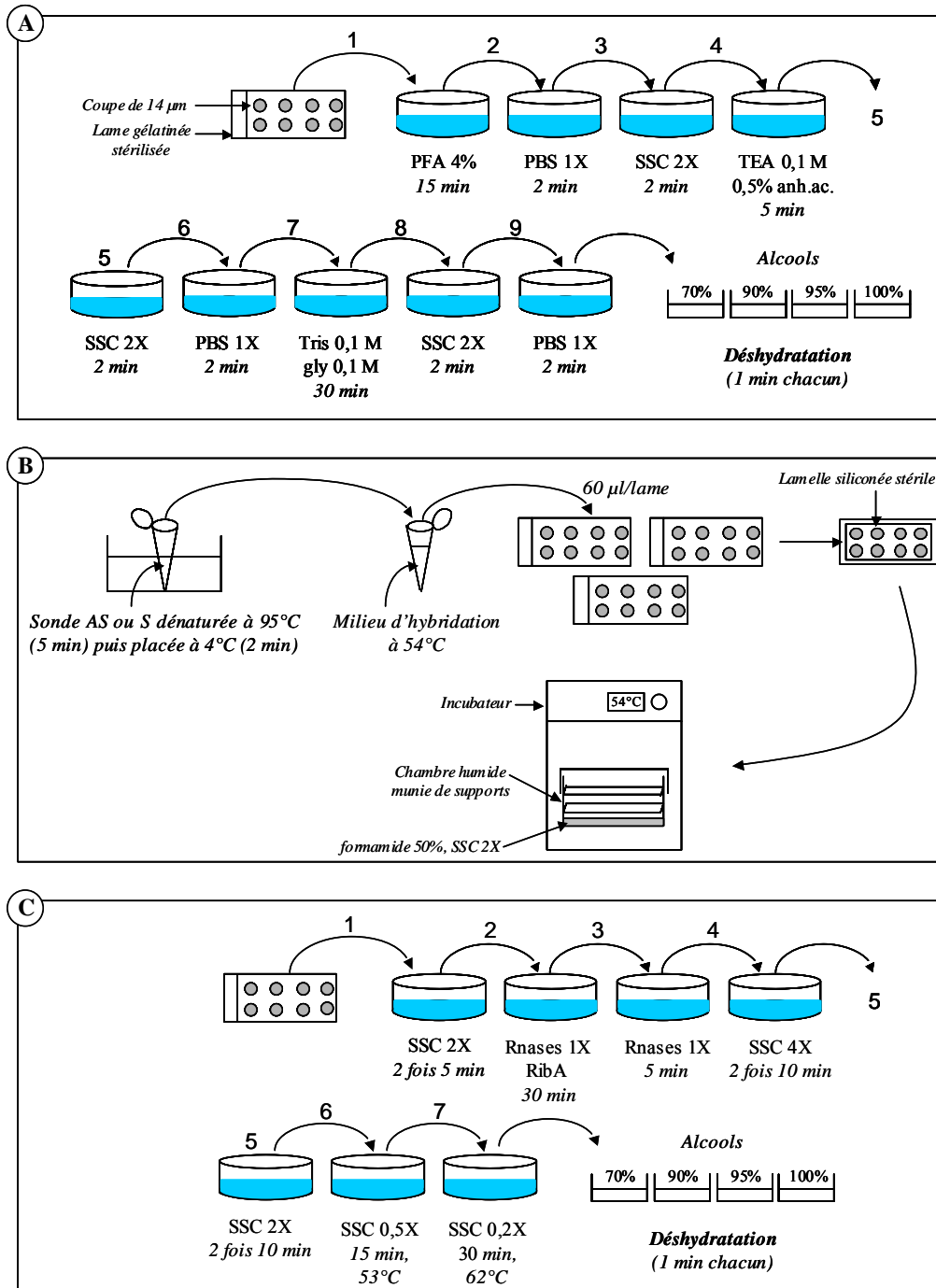


Figure 41 : Représentation schématique du protocole d'hybridation *in situ*.

A. Préhybridation. **B.** Hybridation. **C.** Posthybridation.

anh.ac., anhydride acétique; gly, glycine; PBS, tampon phosphate salin; PFA, paraformaldéhyde; RibA, ribonucléase A; Rnases, tampon Rnases; SSC, tampon citrate salin; TEA, triéthanolamine.

◆ *Préhybridation*

Afin de préserver la qualité des tissus, le premier traitement consiste en une fixation par le paraformaldéhyde 4% dans du tampon phosphate (PBS) 1X (à partir d'un stock de PBS10X : 80g NaCl, 2g KCl, 11.5g Na₂HPO₄ anhydre, 2g KH₂PO₄, qsp 1l H₂O autoclavée). Les lames sont ensuite rincées dans un premier bain salin de PBS 1X puis dans un second de tampon citrate de sodium (SSC) 2X (Euromedex). Les coupes sont soumises à un second traitement, triéthanolamine 0.1M, en présence d'anhydride acétique qui permet de diminuer les sites de liaisons non-spécifiques en empêchant la formation de liaisons électrostatiques entre la sonde et le tissu. Après rinçage avec du SSC 2X, puis du PBS 1X, les lames sont immergées dans une solution tampon de Tris 0.1M contenant de la glycine afin de diminuer encore davantage les sites de liaisons non-spécifiques. Après un nouveau rinçage identique au précédent, les coupes sont déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (de 70 à 100%) pour éviter la dilution du milieu d'hybridation donc d'homogénéiser la concentration de sonde appliquée sur chaque lame. Les lames sont séchées à l'air libre avant hybridation.

◆ *Hybridation*

La sonde est dénaturée (95°C, 5min) puis sa renaturation est bloquée (4°C, 2min) avant d'être mélangée au milieu d'hybridation préchauffé à 54°C. Les proportions de la sonde et du milieu d'hybridation sont calculées en fonction de la concentration de sonde requise. Le milieu d'hybridation permet de saturer les sites non-spécifiques, d'éviter l'oxydation de la sonde et de diminuer la stringence, le volume aqueux et la température de fusion (voir [figure 41B](#)). Les lames sont disposées sur une plaque chauffante (54°C) puis la sonde est déposée sur les coupes à raison de 70µl par lame. Des lamelles en verre siliconées (silicone dans isopropanol, Serva ; étuve, 35°C, 1 nuit) et stérilisées sont disposées sur les lames qui sont ensuite placées au four pendant une nuit, dans une boîte fermée hermétiquement (pour éviter l'évaporation) en présence d'une solution formamide 50%, SSC 2X. La température du four est de 62°C dans le cas des sondes *mCry2* et de 54°C pour les autres sondes.

◆ *Posthybridation*

Les différents traitements de posthybridation permettent de diminuer le bruit de fond par élimination par une ribonucléase des sondes non hybridées et suppression des hybridations non-spécifiques par des bains successifs de stringence croissante (voir [figure 41C](#)). Les lamelles sont retirées des lames qui sont rincées dans 2 bains successifs de SSC 2X. Les coupes sont ensuite traitées par la ribonucléase A (2µg/µl, Sigma) dans un bain de tampon

ARNase 1X (à partir d'un stock de tampon ARNase 10X : 100ml Tris 1M pH7,4 ; 20ml EDTA 0,5M pH8 ; 292.2g NaCl ; qsp 1l H₂O pure). Après un lavage dans du tampon ARNase, les coupes sont immergées dans plusieurs bains successifs, de concentration de sels décroissante et de température croissante. Les coupes sont ensuite déshydratées dans l'alcool puis séchées à l'air libre.

Le matériel contaminé (ependorfs, lamelles, premier bain de rinçage) est récupéré dans une poubelle spécifique puis stocké pendant plusieurs mois jusqu'à disparition de la radioactivité.

◆ *Réalisation d'un autoradiogramme en lumière inactinique*

En chambre noire, un plan film (Bio Max MS, Kodak) est positionné au contact des lames hybridées et d'une lame contenant une gamme standard au ³⁵S ou au ¹⁴C (présentes au laboratoire), dans une cassette étanche que l'on place à l'obscurité pendant une semaine. Les émissions β dues au ³⁵S ionisent les cristaux d'argent contenus dans le plan film ce qui forme une image latente. Par immersion du plan film dans un bain de révélation (4min, D-19, Kodak, dilué 1:4) puis un bain de fixation (3min, Hypam, Ilford, dilué 1:5) suivis tous deux par un rinçage à l'eau courante, une image visible de grains d'argent métallique est alors formée et les cristaux non ionisés sont dissous. On obtient alors un marquage au niveau des émissions β. L'intensité de ce marquage est fonction de la quantité de ³⁵S présente qui est proportionnelle au nombre d'hybrides formés.

◆ *Exploitation de l'autoradiogramme*

Un analyseur d'images (Biocom, Rag 200) permet de mesurer la transmission du plan film. L'étalonnage par la gamme standard au ³⁵S permet de mettre en relation la densité optique et la quantité de radioactivité qui, elle-même correspond à un niveau relatif d'ARNm endogène. Par coupe, deux mesures de densité optique (DO) sont effectuées dans les SCN et deux autres dans la zone périventriculaire (zone d'hybridation "non spécifique" car n'exprimant pas de gène horloge d'après la littérature). La soustraction de la moyenne obtenue dans la zone non spécifique de celle des NSC permet d'obtenir le niveau correspondant à l'hybridation spécifique, donc un niveau relatif d'ARNm. Pour chaque animal, une moyenne est calculée à partir des mesures obtenues pour trois coupes. Pour chaque point horaire, nous avons donc plusieurs valeurs correspondantes aux moyennes obtenues pour chaque animal. Comme la variabilité intra-individuelle est inférieure à la variabilité inter-individuelle pour chaque point horaire, nous calculons la moyenne de l'ensemble des moyennes obtenues pour chaque animal.

2.2. TECHNIQUE 2.

Au cours de mon stage effectué dans le laboratoire de David Hazlerigg (Aberdeen, Scotland, UK), j'ai pu apprendre une autre façon d'effectuer des hybridations *in situ* avec des ribosondes radioactives. La préparation des plasmides est identique à celle vu précédemment mais la réalisation de certaines étapes (synthèse de sondes et hybridation) étant différente, elles sont détaillées ci-après.

2.2.1. Synthèse des sondes.

Dans l'ordre, sous hotte, sont ajoutés 7.5µl de DEPC-H2O, 2.5µl de tampon de Transcription 10X, 2.5µl (approx. 1 µg) d'ADNc, 1µl de chaque rC/G/A-TP (ou 3µl d'une mélange 1:1:1), 1µl de DTT 0.75M, 1µl soit 1U de RNAsine (pour inhiber les ARNases), 4µl de ³⁵S-UTP (50µCi) et 1µl d'enzyme de transcription (T3,T7 ou SP6, 10U/µl). La réaction de transcription s'effectue à 37°C pendant 2h puis après ajout de 2µl ADNase encore pendant 30min. Après avoir doublé le volume du milieu de synthèse de ribosonde avec de l'eau autoclavée, ce milieu est déposé sur une colonne (Chroma-spin30; Ozyme) préalablement équilibrée qui est mise à centrifuger, pendant 5min à 700rcf. Le principe de la colonne est de retenir les molécules dont le poids est inférieur à 17pb. Ainsi, le ³⁵S-UTP non incorporé et le plasmide digéré sont retenus dans la colonne. La sonde purifiée éluée est utilisée tout de suite ou stockée à -20°C. Afin de vérifier le pourcentage d'incorporation de l'UTP radioactif, une fraction (1µl) du mélange est prélevée avant et après centrifugation et placée dans 4ml de scintillant, permettant ainsi de procéder au comptage de la radioactivité en cpm avec un compteur d'émissions β.

2.2.2. Hybridation.

◆ *Préhybridation*

La fixation s'effectue à 4°C en présence de paraformaldéhyde à 4% dilué dans du tampon phosphate (PB) 0.1M (solution mère à 1M : 227.2g Na₂HPO₄ anhydre, 50.25g NaH₂PO₄-H₂O, qsp 2l H₂O, 2ml diethylpyrocarbonate, une nuit sous hotte puis autoclavée). Deux lavages successifs au PB 0.1M (5min) permettent d'éliminer le reste de paraformaldéhyde. Ensuite, le traitement par l'anhydride acétique en présence de triéthanolamine 0.1M (1ml d'anhydride acétique pour 500ml de triéthanolamine) est fait pendant 10min sous agitation. Un nouveau

lavage (2 fois 5min au PB 0.1M) est alors effectué avant la déshydratation par des bains d'alcool de concentration croissante (de 70% à 100%, 3min par bain). Les lames sont ensuite séchées à l'air libre jusqu'à l'hybridation.

◆ *Hybridation*

Le volume prélevé de sonde est calculé de façon à pouvoir déposer au minimum 10^6 cpm par lame avec un volume de dépôt égal à 80 μ l par lame. Pour 50 lames, ce volume de sonde est mélangé avec 200 μ l d'ARNt 10mg/ml ; 40 μ l de DTT 1M ; qsp 460 μ l H₂O autoclavée. Ce mélange est ensuite ajouté à 4ml de milieu d'hybridation. Celui-ci est constitué de 2.5ml de formamide, 300 μ l NaCl 1M, 100 μ l de Denhardts 50X, 50 μ l de TRIS 1M pH8, 10 μ l d'EDTA 0.5M, 40 μ l d'H₂O et 1ml de Dextran sulfate 50%. Ce mélange est alors déposé (80 μ l) sur une lamelle stérile. Chaque lame est alors déposée sur la lamelle et forme un ensemble scellé avec une colle pour histologie (DPX, Fluka). Les lames sont enfin placées au four à 54°C pour une nuit.

◆ *Posthybridation*

Après avoir enlevé la colle, les lames sont immédiatement plongées dans une solution de SSC 4X. Puis les lamelles sont enlevées à leur tour et les lames sont alors plongées 5min dans un second bain de SSC 4X puis dans un troisième bain de SSC 4X. Un traitement par la ribonucléaseA (600 μ l à 10mg/ml pour 300ml de tampon ARNase) à 37°C pendant 30min est alors effectué. Le tampon ARNase utilisé ici est formé de 30ml NaCl 5M, 3ml de TRIS 1M pH8, 600 μ l d'EDTA 0.5M, qsp 300ml H₂O. Ensuite, les lames sont plongées pendant 5min en présence de DTT dans plusieurs bains de stringence croissante (de SSC 2X à SSC 0.1X et de température ambiante à 60°C). Les coupes subissent enfin une déshydratation identique à la préhybridation puis sont mises à sécher à l'air libre, pendant 1 heure.

◆ *Exploitation de l'autoradiogramme*

L'obtention de l'autoradiogramme est identique à la méthode du laboratoire strasbourgeois sauf pour l'utilisation de film MR (Bio Max MS, Kodak) à la place des films MS. Les films sont ensuite scannés et l'image est traitée avec le logiciel Image J (NIH) en utilisant comme gamme étalon des standards de densité optique non radioactifs (Aberdeen) ou au ¹⁴C (Strasbourg).

Le deuxième protocole d'hybridation *in situ* offrant de meilleur rapport signal/bruit de fond, je me suis servi de celui-ci pour la suite de ma thèse.

3. Dosages radioimmunologiques.

Les concentrations en prolactine et en mélatonine plasmatique ou en mélatonine dans la glande pinéale, sont déterminées par des dosages radioimmunologiques spécifiques. Cette méthode est basée sur la compétition d'un ligand "froid" et du même ligand radioactif marqué à l'iode 125 sur un anticorps spécifique. Une fois que l'équilibre de fixation sur l'anticorps est atteint, on isole la fraction liée à l'anticorps. La radioactivité (de type gamma) est ensuite quantifiée, et en référence à une gamme étalon, les concentrations en mélatonine et en prolactine sont déduites.

Pour le dosage de la prolactine, la méthode utilisée est celle décrite par McNeilly et Andrews en 1974. Pour le dosage de la mélatonine, un anticorps polyclonal spécifique pour la mélatonine (R 19540 *INRA*, Nouzilly, France, pour les expériences effectuées à Strasbourg et PF-1288 ; SPI-BIO, Paris, France, pour celles réalisées à Aberdeen) a été utilisé, à une concentration finale de 1/90000. A raison de 100 µl, cet anticorps est mis en présence de 25 µl d'échantillon (ou de standard de la gamme étalon) et de 100 µl de mélatonine marquée (10000 cpm/100 µl), durant au moins une nuit à 4 °C afin d'atteindre l'équilibre de liaison sur l'anticorps. Après cette incubation, la fraction liée à l'anticorps est précipitée avec du sérum de mouton anti-lapin (*INRA*, Nouzilly, France). Cette précipitation est suivie d'une centrifugation (4000 rpm, 30 min à 4 °C) et le surnageant obtenu est aspiré. La radioactivité des culots est alors quantifiée et la concentration de mélatonine déterminée.

Les dosages radioimmunologiques ont été réalisés, chez le mouton, par l'équipe du Dr Gérard Lincoln et, chez les rongeurs, par le Dr Berthe Vivien-Roels.

4. Statistiques et Modélisations mathématiques.

L'analyse statistique a été réalisée en 2 étapes : des analyses de variance ont permis de déterminer si l'expression des gènes (ou la présence des hormones) était dépendante du temps. Une analyse de la variance à deux facteurs, suivie d'une analyse post-hoc a permis de montrer des différences d'expression des gènes/de présence des hormones en fonction des traitements. Dans certains cas où nous voulions quantifier précisément ces effets, des régressions non linéaires ont été calculées. Dans tous les cas, un effet est considéré comme significatif si $p < 0.05$.

4.1. Analyse de la variance.

Les analyses de variance ont été réalisées en fonction des expériences à l'aide des logiciels Minitab® ou Prism. Une ANOVA à un facteur (facteur horaire) est effectuée pour déterminer un éventuel effet du temps. Ensuite, une seconde ANOVA à 2 facteurs (facteur horaire et facteur traitement) est effectuée et l'étude de l'interaction horaire*traitement a permis de déterminer si le traitement influe sur les données mesurées en fonction du temps. Une analyse post-hoc (tests de Bonferroni ou de Tukey en fonction des expériences) permet de montrer quelles valeurs sont différentes des autres de façon statistiquement significative. En fonction des études, le facteur traitement correspond aux conditions d'éclairement (LD vs DD, LP vs SP, SP de courte durée vs SP de longue durée) ou aux conditions d'injection (mélatonine vs saline ou implant contenant de la mélatonine vs implant sans mélatonine).

4.2. Régressions non linéaires.

L'analyse post-hoc ne donnant aucune quantification précise des effets, j'ai eu recours à des régressions non linéaires des profils d'expression des ARNm (ou de présence des hormones), en utilisant le logiciel Sigmaplot®. En fonction des études, deux types de régressions ont été utilisés.

4.2.1. Analyse du cosinor.

La première formule mathématique utilisée correspond à l'analyse du cosinor. Cela nous a permis de chercher une courbe modélisant des variations d'une donnée sur 24 heures précisément. L'équation correspondante est : $y = A + (B * \cos(2\pi(x - C) / 24))$, où A est le niveau moyen, B l'amplitude et C l'acrophase du pic. Dans certains cas, un test-t a été utilisé pour comparer deux conditions entre elles.

4.2.2. Equation à un ou deux pics logistiques.

En fonction des profils d'expression obtenus, une régression non linéaire permettant l'apparition d'un ou deux pics, a été recherchée.

4.2.2.1. Equation à un pic logistique.

Dans les diverses études où nous étudions l'effet de la photopériode sur l'expression des gènes et sur la présence de mélatonine, une équation permettant de quantifier précisément l'effet de la photopériode sur différents critères, a été utilisée. Les profils d'expression ont été linéarisés en utilisant l'équation d'une courbe à un pic logistique :

$$f = y_0 + (y_{\max} / ((1 + \exp(\text{slope}_1 * (\phi - x))) * (1 + \exp(\text{slope}_2 * (x - \phi - d))))))$$

La régression permet de déterminer 4 valeurs :

- 1/ le niveau minimal moyen de l'expression de l'ARNm (y_0).
- 2/ le niveau maximal moyen de l'expression de l'ARNm (y_{\max}).
- 3/ le temps de demi-montée, qui correspond à l'heure où la présence des l'ARNm atteint 50% de la présence maximale (ϕ).
- 4/ la durée du taux maximal des ARNm (d).

Ensuite, une seconde régression non linéaire combinée aux deux photopériodes comparées, permet d'augmenter la puissance du test puisque la régression est réalisée à partir de l'ensemble des données de chaque condition photopériodique. Cette régression est calculée avec l'équation :

$$f = (y_0 + \Delta_B) + ((y_{\max} + \Delta_A) / ((1 + \exp(\text{slope}_1 * (\phi - x + \Delta_\psi))) * (1 + \exp(\text{slope}_2 * (x - \phi - \Delta_\psi - d - \Delta_d)))))$$

et, elle permet de déterminer 4 valeurs :

- 1/ la différence de niveau de base (Δ_B).
- 2/ la différence d'amplitude entre les 2 photopériodes (Δ_A).

3/ l'avance (ou le retard) de phase au temps de demi-montée (Δ_ψ).

4/ la différence de durée du taux maximal des ARNm (Δ_d).

Un effet sur l'ensemble de ces variables (niveau basal, amplitude du rythme, phase du rythme (au temps de demi-montée), durée du pic des ARNm) a toujours été recherché. Cependant, pour faciliter la lecture, le résultat de ces calculs ne sera présenté que dans les cas où les effets recherchés sont significatifs. Ces tests sont les plus précis pour comparer les résultats obtenus dans nos diverses conditions d'éclairement ou d'injection, et seront donc à la base des discussions lorsque les valeurs mesurées pour chaque condition permettent leur réalisation.

4.2.2.2. Equation à deux pics logistiques.

Dans la première étude ([chapitre D.1.1.](#)), dans le cas du gène *Cry2*, une modélisation à deux pics logistiques a dû être utilisée. En effet, aucune régression non linéaire à un pic logistique n'était significative. Nous avons donc utilisé la régression suivante :

$$f = y_0 + (y_{\max_1} / ((1 + \exp(\text{slope}_1 * (\phi_1 - x))) * (1 + \exp(\text{slope}_2 * (x - \phi_1 - d_1)))))) \\ + (y_{\max_2} / ((1 + \exp(\text{slope}_3 * (\phi_2 - x))) * (1 + \exp(\text{slope}_4 * (x - \phi_2 - d_2))))))$$

Les symboles correspondent à ceux utilisés précédemment. Pour comparer les données obtenues dans les deux conditions photopériodiques, nous avons donc cherché les effets aussi bien sur le premier pic que sur le second. La formule utilisée est donc :

$$f = (y_0 + \Delta_B) + ((y_{\max_1 + \Delta_A} / ((1 + \exp(\text{slope}_1 * (\phi_1 - x + \Delta_\psi))) * (1 + \exp(\text{slope}_2 * (x - \phi_1 - \Delta_\psi - d_1 - \Delta_d)))))) \\ + ((y_{\max_2 + \Delta_{A2}} / ((1 + \exp(\text{slope}_3 * (\phi_2 - x + \Delta_{\psi 2}))) * (1 + \exp(\text{slope}_4 * (x - \phi_2 - \Delta_{\psi 2} - d_2 - \Delta_{d2}))))))$$

ce qui nous a permis de chercher un effet significatif sur les mêmes critères que précédemment et sur les deux pics.

D. Résultats & Discussions

1. Influence de la photopériode sur le fonctionnement nycthéméral de l'horloge circadienne.

1.1. CHEZ LE HAMSTER SYRIEN.

1.1.1. Introduction.

Nous avons vu précédemment que la génération et le maintien de la rythmicité circadienne étaient liés à l'existence de boucles moléculaires transcriptionnelles et traductionnelles faisant intervenir plusieurs gènes, les gènes horloges (Reppert & Weaver, 2002). L'expression de ces gènes apparaît régulée non seulement sur le plan journalier mais aussi sur le plan saisonnier. En effet, quelques données de la littérature montrent qu'un changement du régime photopériodique, de LP vers SP, induit un raccourcissement de la durée des pics d'ARNm et de protéines des gènes *Per1* et *Per2* (Messenger *et al.*, 1999, 2000 ; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000 ; Steinlechner *et al.*, 2002). Ces données sont incomplètes car elles ne concernent qu'une faible partie de l'horloge moléculaire des SCN et ne permettent donc pas de prédire précisément le fonctionnement saisonnier des SCN. De plus, les études préliminaires ont été effectuées chez le rat et la souris, deux espèces dont la physiologie n'est pas typiquement photopériodique.

Nous avons donc décidé d'étudier l'expression de l'ensemble des gènes horloges connus alors chez le hamster syrien, en fonction de deux conditions photopériodiques : LD14:10 (LP) et LD10:14 (SP). L'étude a été effectuée par détection des ARNm endogènes codant les protéines horloges par hybridation *in situ* radioactive.

1.1.2. Résultats.

Les expressions des gènes horloges dans les SCN du hamster syrien sont présentées [figure 42](#). Le ZT0 a été choisi comme étant l'apparition du jour et a été pris comme temps de référence pour comparer les deux photopériodes. Les différences entre les photopériodes SP et LP en termes de durée, d'amplitude, de niveau basal et de décalage de phase (au temps de demi-montée) ont été recherchées et sont présentées comme valeur calculée \pm SEM. Les résultats de l'ANOVA à un et à deux facteurs (*F* test) sont vérifiés comme suit : ***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$.

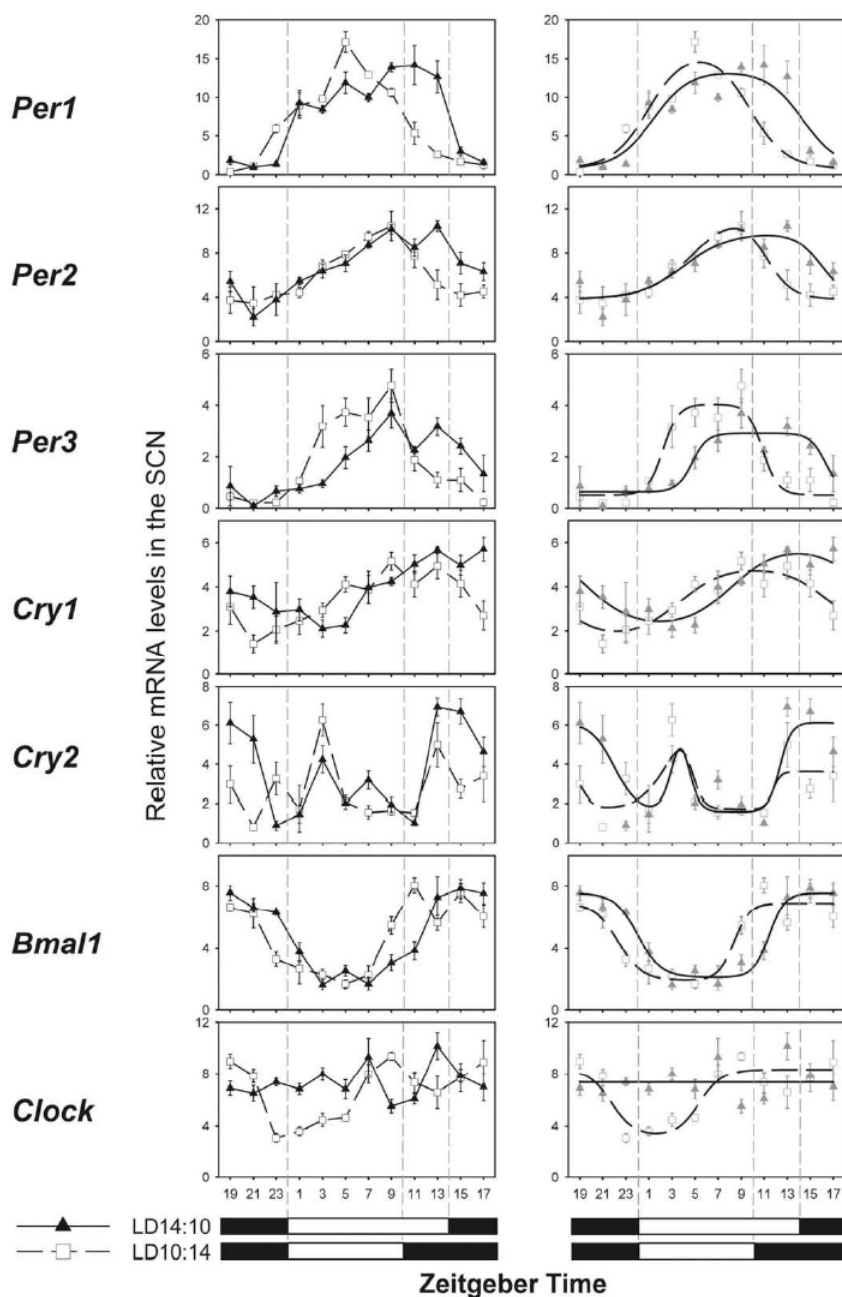


Figure 42 : Expression journalière des gènes horloges dans les SCN du hamster Syrien dans deux conditions photopériodiques.

Gauche : niveaux d'ARNm des gènes horloges déterminés par hybridation *in situ* radioactive en LP (LD14:10, triangles) et en SP (LD10:14, carrés). Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux. **Droite** : régression non linéaire des niveaux d'ARNm en LP (lignes continues) et en SP (lignes discontinues). Les régressions sont calculées avec une équation à un pic logistique pour *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Bmal1* et *Clock* (sauf en LP où la ligne représente la moyenne de l'ensemble des valeurs de cette photopériode) et à deux pics pour *Cry2* (voir paragraphe D.1.1.2. pour les détails).

Une expression journalière des ARNm des gènes *Periods* est observée en SP et en LP. En LP, les expressions maximales sont obtenues vers ZT9 pour *Per1*, ZT12 pour *Per2* et ZT7-13 pour *Per3*. En SP, les pics apparaissent à ZT5 pour *Per1*, ZT9 pour *Per2*, et ZT4-8 pour *Per3*. La photopériode a une large influence sur la durée des pics de *Per1*, *Per2*, et *Per3* avec des pics plus courts en SP ($-2h26\pm0h48^{**}$, $-3h59\pm0h43^{***}$, $-3h06\pm1h01^{**}$ respectivement). La SP induit également une avance de phase du pic de *Per1* ($-1h18\pm0h34^*$) et de *Per3* ($-2h24\pm0h41^{***}$). De plus, l'amplitude du pic de *Per3* en SP est augmentée ($+49.9\pm15.3\%^{**}$).

Un rythme des niveaux d'ARNm des *Cryptochromes* est observé sous les deux régimes photopériodiques. La présence des ARNm de *Cry1* présente un pic vers ZT13 en LP et ZT10 en SP. La durée du pic n'est pas affectée par la photopériode. Néanmoins, en SP par rapport à LP, le pic des ARNm de *Cry1* est en avance de phase ($-3h43\pm0h26^{***}$) et le niveau basal est réduit ($-23.1\pm6.0\%^{***}$). Pour *Cry2*, les profils sont biphasiques, avec un petit pic à ZT3 dans les deux photopériodes et des niveaux élevés à la transition jour/nuit en LP et durant la nuit en SP. La photopériode n'a pas d'influence sur le pic à ZT3 et le second pic est, quant à lui, raccourci ($-2h52\pm1h17^*$) et de plus faible amplitude ($-55.2\pm17.1\%^{**}$) en SP.

L'expression de *Bmal1* est rythmique dans les deux photopériodes avec des maximums obtenus la nuit entre ZT14 et ZT20 en LP et ZT11-ZT18 en SP. La seule différence significative est une avance de phase en SP par rapport à LP ($-2h25\pm0h23^{***}$).

Enfin, les niveaux des ARNm du gène *Clock* montrent des variations en LP ($p<0.01$, ANOVA; $F_{11,36}=3.10$) comme en SP ($p<0.001$, ANOVA $F_{11,36}=7.51$). Néanmoins, des régressions non-linéaires avec un ou deux pics logistiques ne peuvent pas correspondre aux niveaux d'ARNm de *Clock* en LP. A l'inverse, l'analyse de la régression montre un rythme des ARNm de *Clock* en SP avec des valeurs plus faibles de ZT22 à ZT5.

Ce premier travail a été publié dans Neuroscience en 2003.

1.1.3. Discussion.

A notre connaissance, notre étude décrit pour la première fois les profils journaliers des gènes *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* et *Clock* chez un rongeur photopériodique. Nos résultats montrent que les profils d'expression de l'ensemble des gènes horloges étudiés sont affectés par un changement de photopériode, mais selon des modalités différentes.

Dans les conditions naturelles, l'augmentation ou la réduction progressive de la photopériode affecte à la fois les transitions jour/nuit et nuit/jour. Dans les conditions de laboratoire, les animaux subissent un changement abrupt de la photopériode et sont maintenus plusieurs semaines (8 dans notre cas) en photopériode stable. Comme la lumière paraît être le Zeitgeber le plus puissant, nous avons fait le choix (arbitraire) de définir l'arrivée de la lumière comme étant le ZT0 et de présenter les résultats en fonction de ce ZT, même si un modèle alternatif a été proposé (Daan *et al.*, 2002). De ce fait, les effets photopériodiques d'avances de phase doivent être compris avec le ZT0 comme référence.

Les régressions non-linéaires des profils journaliers permettent de comparer statistiquement les effets de la photopériode. Nos résultats confirment les études préalables montrant des pics d'ARNm de *Per1* et de *Per2* raccourcis en LD8 :16 comparés à LD16:8 (Messenger *et al.*, 1999, 2000 ; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000 ; Steinlechner *et al.*, 2002). Dans notre étude, les hamsters syriens étaient maintenus en LD14:10 et LD10:14. Même dans ces conditions de différences moindres entre les deux conditions lumineuses, des variations photopériodiques pour la durée de présence des ARNm de *Per1* et de *Per2* sont observées (2h26±0h48 et 3h59±0h43, respectivement). Ces différences sont plus faibles que celles décrites dans les études avec 16h ou 8h de lumière. De plus, en utilisant l'expression de *c-fos* induite par la lumière, chez le hamster syrien dans 3 conditions photopériodiques, le laboratoire avait déjà montré que la durée de la phase photosensible des SCN est dépendante de la durée de la nuit (Vuillez *et al.*, 1996). L'ensemble de ces données permet de conclure que **le système journalier est régulé par la durée de la photopériode.**

Comme ceux des gènes *Per1/2*, les niveaux d'ARNm de *Per3* présentent également un pic de durée réduite en SP comparé à LP. Cependant, l'expression des trois gènes *Pers* est très différente. Seuls *Per1* et *Per3* montrent des avances de phase en SP par rapport à LP, de plus, seul *Per3* a des quantités d'ARNm plus élevées en SP. Nous montrons que l'expression de *Cry1* est rythmique avec un profil sinusoïdal très similaire entre les deux photopériodes. Le

rythme présente une avance de phase et une diminution du niveau basal en SP. A l'inverse, les profils d'expression de *Cry2* présentent deux pics, dans les deux photopériodes. Le profil d'expression du gène *Cry2* mais pas du gène *Cry1* est donc en contradiction avec les profils décrits dans la littérature. Chez la souris, par exemple, l'expression de *Cry1* est rythmique alors que les résultats pour *Cry2* sont controversés (Miyamoto & Sancar, 1998, 1999 ; Kume *et al.*, 1999 ; Okamura *et al.*, 1999). En effet, soit l'expression de *Cry2* est arythmique, soit elle est rythmique et présente alors un pic d'ARNm à la transition jour/nuit. Le second pic que nous décrivons ici pourrait correspondre à celui trouvé chez la souris. Concernant le premier pic, des différences inter-espèces mais aussi la fréquence des prélèvements (toutes les deux heures dans notre cas) pourraient expliquer sa présence dans notre étude. Chez le hamster syrien, nous avons observé que la SP affecte l'expression de *Cry2* par diminution de la durée et de l'amplitude du pic durant la nuit. Le rôle physiologique du pic observé en début de jour est inconnu. Pour *Bmal1*, la présence rythmique de ses ARNm en SP est en avance de phase par rapport à la condition LP. De manière surprenante, le pattern d'expression de *Clock* est très différent entre LP et SP. Alors que cette expression est continuellement élevée en LP, un pattern rythmique est observé en SP avec des niveaux diminués, de la fin de nuit jusqu'au milieu de jour.

Si nous considérons le modèle moléculaire en vigueur actuellement, la diminution de la durée des pics de *Per1/2/3* et de *Cry2* en SP, pourrait être due à une diminution de la stimulation transcriptionnelle par l'hétérodimère CLOCK/BMAL1. Or, en effet nous observons une diminution des niveaux des ARNm du gène *Clock* en SP. Cependant, les quantités de protéines CLOCK ne sont pas forcément diminuées. Mais, si nous supposons qu'une relation linéaire existe entre les taux d'ARNm et de protéine (Yang & Sehgal, 2001), nous pouvons imaginer que l'apparition d'un rythme d'expression du gène *Clock* en SP est importante pour l'établissement d'une nouvelle relation de phase entre acteurs négatifs (gènes *Pers* et *Crys*) et positifs des boucles de régulations. Les niveaux d'ARNm de *Clock* diminuant en fin de nuit en SP, on peut supposer des niveaux plus faibles de protéine CLOCK pendant le jour, d'où une diminution de la formation des hétérodimères CLOCK/BMAL1 provoquant une activation transcriptionnelle réduite et de ce fait, des durées de pics raccourcies pour les gènes *Pers* et *Crys*.

La durée plus courte du pic de *Per2* que nous observons en SP pourrait être responsable du pic plus court de la protéine PER2 reporté par Nuesslein-Hildesheim *et coll.* (2000). Si PER2

joue un rôle dans la transactivation du gène *Bmal1* (Shearman *et al.*, 2000a ; Yu *et al.*, 2002), on peut alors supposer la présence d'un pic également plus court pour *Bmal1* en SP, mais cet effet n'est pas observé. Comme la période de l'horloge reste identique, indépendamment de la photopériode (l'entraînement par le cycle lumière/obscurité étant toujours de 24heures), des mécanismes additionnels comme des phosphorylations (Lee *et al.*, 2001 ; Lowrey & Takahashi, 2004), des variations pour les taux et les vitesses de dégradations protéiques (Yagita *et al.*, 2002) ou encore des régulations complexes aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, permettraient d'expliquer que la durée du pic de *Per2* varie mais pas celle de *Bmal1*. De plus, notre étude n'a pas porté sur le gène *Rev-erb α* car nous ne disposions pas encore à l'époque de la sonde dirigée contre ses ARNm. Comme l'effet de PER2 sur la transcription de *Bmal1* n'est pas direct mais s'effectue par l'intermédiaire d'une diminution de la transcription de *Rev-erb α* (dont la protéine inhibe celle de *Bmal1*) une étude présentant les variations des quantités d'ARNm de *Rev-erb α* est nécessaire pour mieux comprendre les relations entre PER2, *Bmal1* et donc *Rev-erb α* . De plus, afin de vérifier que l'effet observé ici n'est pas spécifique au hamster syrien, la nouvelle étude devra s'effectuer chez une autre espèce de rongeur à physiologie saisonnière. Une étude chez le hamster d'Europe a de ce fait été effectuée (voir [chapitre D.1.2.](#)).

Dans la problématique qui est de comprendre l'effet de la photopériode sur l'expression des gènes horloges dans les SCN, un modèle suppose l'existence d'un oscillateur du matin et un oscillateur du soir (Pittendrigh 1960, 1972) qui seraient d'après Daan et coll. (2001) dirigés par *Per1/Cry1* et par *Per2/Cry2*, respectivement. Dans notre étude, les profils d'ARNm de *Per1* et de *Per2* peuvent confirmer cette hypothèse. En effet, les profils de *Per1* et de *Per2* pourraient être centrés sur l'aube et le crépuscule, respectivement. Cependant, le profil d'expression de *Cry1* et celui de *Cry2* ne correspondent pas au modèle. Dans les deux photopériodes, l'expression maximale de *Cry1* est strictement corrélée avec la transition jour/nuit et serait alors un acteur de l'oscillateur du soir et non de celui du matin. De plus, le pic d'expression de *Cry2* est effectivement corrélé à la transition jour/nuit en LP, ce qui est attendu pour un oscillateur du soir, mais pas dans les conditions SP. Nos résultats ne sont donc pas en accord avec l'hypothèse de l'équipe de Daan. Si les oscillateurs du matin et du soir existent réellement, ils semblent peu probable que leur support soit *Per1/Cry1* pour le premier et soit *Per2/Cry2* pour le second.

Aussi, un changement photopériodique retentit essentiellement sur la durée d'expression des *Pers*. Un effet stimulateur de la lumière a été montré pour *Per1* et *Per2*, chez la souris (Albrecht *et al.*, 1997 ; Shearman *et al.*, 1997 ; Shigeyoshi *et al.*, 1997) et chez le hamster syrien (Moriya *et al.*, 2000), alors que *Per3* n'est pas directement inductible par un créneau de lumière ni chez la souris (Takumi *et al.*, 1998a ; Zylka *et al.*, 1998) ni chez le hamster syrien (Moriya *et al.*, 2000). Donc, **la durée de la période lumineuse est probablement intégrée en premier par la durée d'expression des gènes *Per1* et *Per2***. Cet effet pourrait induire un ajustement progressif de l'expression des autres composants de l'horloge circadienne jusqu'à la formation d'un état stable correspondant à la photopériode présente. Une nouvelle étude, en effectuant des mesures des niveaux d'ARNm après avoir placé les animaux pendant différentes durées en SP devrait permettre de répondre à cette question. Nous avons donc effectué ce décours temporel de l'effet d'un changement de photopériode chez le hamster syrien (voir [chapitre D.2.1.](#)).

Cette première étude montre que l'horloge moléculaire contenue dans les SCN fonctionne différemment en fonction des conditions photopériodiques. Cette expérience réalisée en conditions LD reflète d'avantage l'adaptation de l'horloge moléculaire à une photopériode que des mécanismes endogènes ; il pourrait s'agir d'une *lecture passive* de la durée du jour extérieur. Ces travaux ont été confirmés par de nombreuses études menées chez le hamster sibérien (Johnston *et al.*, 2005), le hamster syrien (Carr *et al.*, 2003 ; Johnston *et al.*, 2003 ; de la Iglesia *et al.*, 2004) et le rat (Sumova *et al.*, 2003). Toutes ces études présentent des variations dans la durée des pics d'expression des *Pers* et, l'équipe de Sumova montre également l'apparition d'un rythme de présence des transcrits du gène *Clock*, avec des niveaux bas en début de jour (Sumova *et al.*, 2003). De plus, comme leurs animaux étaient placés en conditions constantes 24h avant prélèvements, cela prouve le caractère endogène de l'expression photopériodique des gènes horloges. Il y aurait donc bien une véritable *intégration* de la photopériode par les boucles moléculaires et pas seulement une lecture passive jour après jour des conditions d'illumination externes.

Comme les SCN intègrent les variations de la photopériode, ils pourraient être à la base de la construction de messages photopériodiques qui ferait intervenir des gènes contrôlés par l'horloge (CCG). L'activation transcriptionnelle de ces sorties de l'horloge est médiée, du moins en partie, par l'hétérodimère CLOCK/BMAL1, comme cela a été démontré pour le gène *Avp* (Jin *et al.*, 1999). Les différents profils d'ARNm observés pour les gènes *Clock* et

Bmal1 pourraient expliquer le pic plus court des ARNm de l'*Avp* en SP comparé à LP (Jac *et al.*, 2000). La mise en évidence de l'expression des CCG en fonction de la photopériode permettraient de montrer que les SCN élaborent un signal circadien dépendant de la photopériode, que les SCN construisent le message photopériodique. Dans nos études plus récentes, nous avons donc intégré un ou plusieurs CCG (voir [chapitres D.1.2.](#) et [D.2.1.](#)).

En conclusion, nous avons démontré que les patterns d'expression de tous les gènes horloges étudiés sont affectés par la photopériode. Les boucles moléculaires des SCN sont donc modifiées par la photopériode. De plus, ces modifications apparaissent différentes pour chaque gène. En plus de variations de durée, nous avons observé divers effets comme des avances de phase, des changements de niveau de base, d'amplitude et l'apparition d'un rythme dans le cas de *Clock* en SP. Chacun de ces effets est aussi important en terme de présence de protéines, à chaque moment du cycle.

1.2. CHEZ LE HAMSTER D'EUROPE.

1.2.1. Introduction.

Les résultats obtenus chez le hamster syrien montrent que l'horloge circadienne centrale est affectée par les conditions photopériodiques. Nous avons ensuite voulu étudier l'expression des gènes horloges dans les SCN d'une autre espèce de rongeur photopériodique. Parmi les autres espèces à physiologie photopériodique, nous avons choisi le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*), car cette espèce a la particularité de présenter de très importantes variations saisonnières du pic de mélatonine et d'activité locomotrice. En LP, la mélatonine présente ses niveaux annuels les plus bas (Vivien-Roels *et al.*, 1992, 1997) et les hamsters d'Europe présentent un rythme d'activité locomotrice unimodal très marqué (Monecke & Wollnik, 2005). A l'inverse, en photopériode courte, la variation journalière de mélatonine est très importante et les animaux peuvent entrer en hibernation (Wollnik & Schmidt, 1995) ou présenter une activité locomotrice très réduite, bimodale ou arythmique (Monecke & Wollnik, 2005). Dans le but de caractériser l'effet de la photopériode dans les SCN du hamster d'Europe, nous avons quantifié par hybridation *in situ* radioactive, une partie des gènes horloges connus alors. Comme le gène *Rev-erba* a été montré comme faisant partie intégrante de l'horloge et, au vu de son rôle probable dans la régulation de la transcription de *Bmal1*, nous avons décidé de l'intégrer à notre étude. La caractérisation des effets de la photopériode

a donc été recherchée à la fois sur des composants de la boucle positive (*Clock* et *Bmal1*), des boucles négatives (*Per2* et *Rev-erba*) mais aussi, pour mettre en évidence que les SCN distribuent un message journalier différent en fonction de la photopériode, sur un gène contrôlé par l'horloge (*Avp*). Dans chaque photopériode, les prélèvements ont été effectués toutes les 3 heures à raison de 4 (en LP) ou 6 (en SP) animaux par point horaire.

1.2.2. Résultats.

Les animaux ont été élevés dans des conditions naturelles de photopériode, et les prélèvements ont été effectués en juin (LP naturelle d'environ LP16:8) et fin novembre (SP naturelle d'environ SP8:16). Dans ce cas particulier, la représentation en donneur de temps externe, "External Time" (ExtT) proposée par Daan et coll. (2002) paraît être la plus appropriée et a donc été utilisée avec External time 12 (ExtT12) définissant le milieu de la phase lumineuse quelque soit la photopériode. Par cette représentation, le début du jour correspond à ExtT4 en LP et à ExtT8 en SP ([figure 43](#)). Les différences entre SP et LP, en termes de durée, d'amplitude, de niveau basal et de décalage de phase (au temps de demi-montée) ont été recherchées et sont présentées comme valeur calculée \pm SEM. Les résultats de l'ANOVA à un et à deux facteurs (*F* test) sont vérifiés comme suit : ***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$.

L'expression journalière de chacun des gènes étudiés dans les SCN du hamster d'Europe, est affectée par la photopériode ([figure 43](#)).

Les niveaux d'ARNm de *Per2* sont rythmiques dans les deux photopériodes avec un pic situé vers ExtT16. Ce pic présente une plus grande amplitude en LP qu'en SP ($1.97\text{ROD} \pm 0.87^*$).

Un profil rythmique d'expression de *Rev-erba* est observé en LP comme en SP avec un pic entre ExtT12-20 et à ExtT16, respectivement. La photopériode a un effet marqué sur la durée ($-8.84\text{h} \pm 1.09^{***}$) et sur la phase ($+3.03\text{h} \pm 1.38^*$) en SP par rapport à LP. Le niveau basal de présence des ARNm de *Rev-erba* semble être dépendant de la photopériode mais cette différence n'est pas significative ($p > 0.05$).

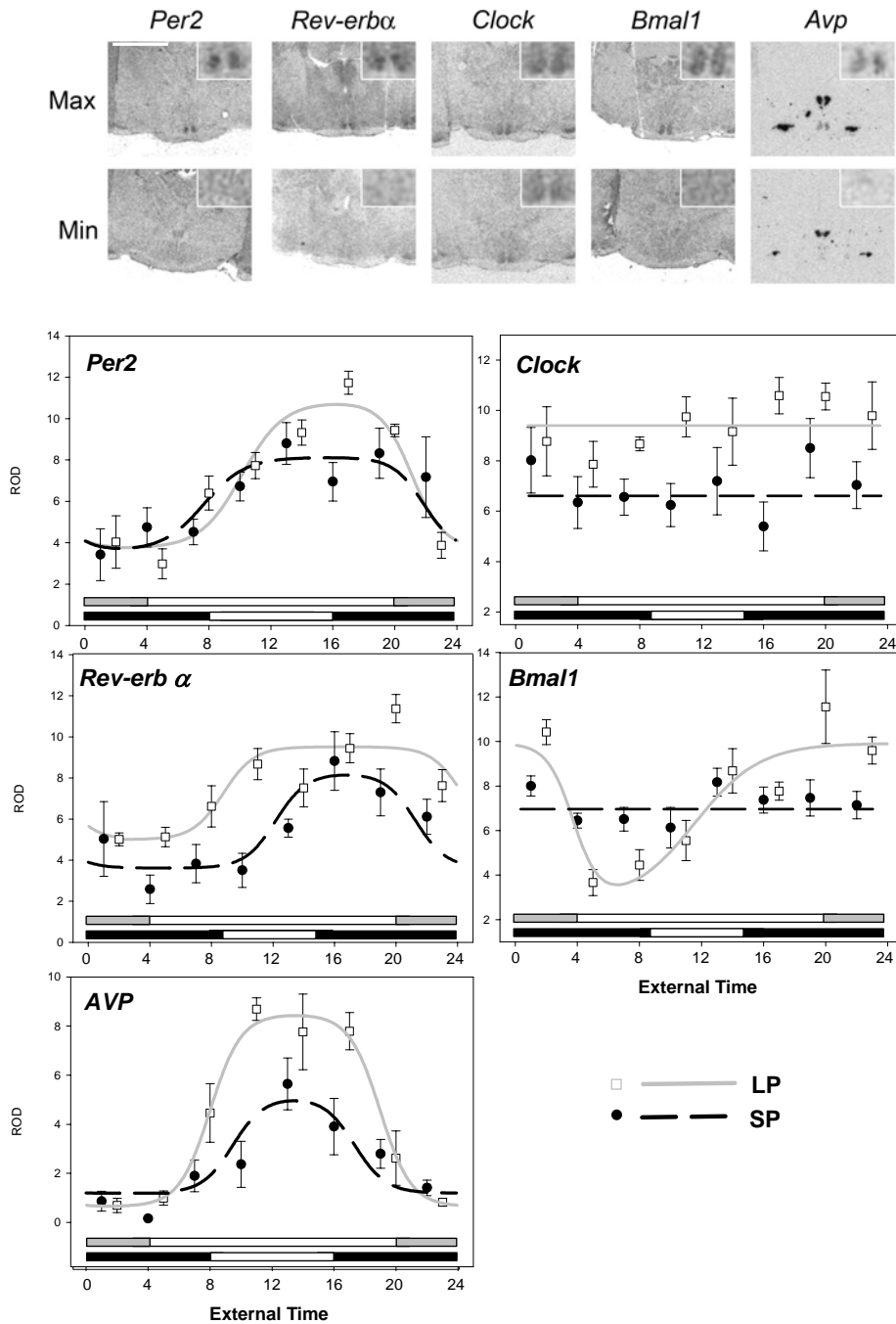


Figure 43 : Expression journalière des gènes horloges dans les SCN du hamster d'Europe dans deux conditions photopériodiques naturelles.

En haut, exemples représentatifs de marquage, obtenus après hybridation *in situ*, correspondants au maximum (Max) et au minimum (Min) en LP, pour chaque gène. La barre blanche représente 5mm. **En bas**, niveaux journaliers d'ARNm des gènes horloges déterminés par hybridation *in situ* radioactive en LP naturelle (LD16:8, carré) et SP naturelle (LD8:16, losanges). Les barres horizontales pleines et vides représentent les périodes d'obscurité et de lumière du cycle L/D respectivement. Les courbes représentent les régressions non linéaires des niveaux d'ARNm des gènes en LP (lignes continues et grises) et en SP (lignes discontinues et noires). Chaque points représente la moyenne \pm SEM de 4 à 6 animaux. ROD : relative optical density.

Les niveaux d'ARNm de *Clock* sont non rythmiques dans les deux photopériodes ($p > 0.05$, ANOVA; $F_{7, 24} = 0.88$ en LP et $F_{7, 40} = 0.9$ en SP). De plus, le niveau moyen est plus faible en SP qu'en LP ($p < 0.01$, ANOVA, effet de la photopériode).

L'expression de *Bmal1* est rythmique uniquement en LP avec un pic compris entre ExtT20 et ExtT3. En SP, son expression n'est pas dépendante du temps ($p > 0.05$, ANOVA, $F_{7, 40} = 1.25$). L'analyse de la variance avec la photopériode comme facteur ne révèle pas de différence pour les niveaux moyens d'ARNm de *Bmal1* mais l'interaction entre photopériode et temps est significative ($p < 0.001$, ANOVA à deux facteurs).

Le profil rythmique d'expression du gène *Avp* présente un pic vers ExtT13.5 dans les deux photopériodes. La photopériode a influencé l'amplitude ($-2.62\text{ROD} \pm 0.8^{**}$) et la durée ($-5.48\text{h} \pm 0.75^{***}$) du pic, avec les valeurs minimales en SP.

Le pic de **mélatonine** présente des variations journalière et saisonnière ([figure 44](#)). L'amplitude du pic varie significativement de 63 ± 10 pg/glande en juin contre 300 ± 41 pg/glande en novembre (***) . La durée du pic est aussi augmentée en SP par rapport à LP ($4.46\text{h} \pm 1.30^{**}$).

Cette étude fait l'objet de la première partie de l'article en préparation n°1.

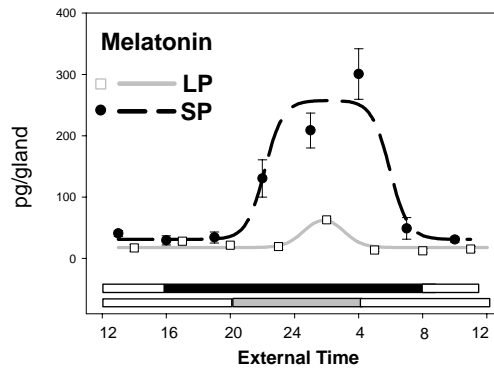


Figure 44 : Variations journalières des quantités de mélatonine pinéaliennne de hamster d'Europe dans deux conditions photopériodiques naturelles.

Variations journalières de la quantité pinéaliennne de mélatonine déterminées par radio-immuno assay en LP naturelle (LD16:8, carré) et SP naturelle (LD8:16, cercles). Les barres horizontales pleines et vides représentent les périodes d'obscurité et de lumière du cycle L/D respectivement. Les courbes représentent les régressions non linéaires des niveaux de mélatonine en LP (lignes continues et grises) et en SP (lignes discontinues et noires). Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 à 6 animaux.

1.2.3. Discussion.

La photopériode est connue pour avoir un fort impact sur la physiologie et les comportements du hamster d'Europe, ce qui fait de lui un modèle attractif pour l'étude des effets de la photopériode sur l'horloge moléculaire des SCN (Wollnik *et al.*, 1991 ; Saboureau *et al.*, 1999 ; Monecke & Wollnik, 2005). Dans les SCN, l'effet général de la photopériode observé sur l'expression des gènes horloges et de *l'Avp*, semble être la présence d'un **amortissement général de l'horloge en SP**, c'est à dire une diminution générale des quantités d'ARNm des gènes horloges et de *l'Avp*. Plus précisément, les niveaux d'ARNm des gènes horloges sont diminués en durée (*Rev-erba*), en amplitude (*Per2*) et en niveau moyen (*Clock*) en SP par rapport à LP. Le pic d'ARNm de *l'Avp*, gène contrôlé par l'horloge (Jin *et al.*, 1999), est diminué à la fois en durée et en amplitude. L'effet le plus marquant de la photopériode est obtenu pour le gène *Bmall*. Alors que clairement rythmiques en LP, les niveaux d'ARNm de *Bmall* sont constitutifs en SP, avec un niveau intermédiaire au cours du cycle LD. Des résultats similaires ont été décrits dans les SCN d'autres espèces en conditions particulières : (1) chez le hamster sibérien, une torpeur induit le jour suivant une disparition du rythme d'expression de *Bmall* mais n'a pas d'effet sur celui de *Per1* (Herwig *et al.*, 2006) et (2) chez le mouton, l'expression de *Bmall* n'est plus rythmique en photopériode réfractaire alors que l'expression des autres gènes reste inchangée (Lincoln *et al.*, 2005). La réduction d'environ un tiers des niveaux moyens de *Clock* en SP, est également intéressante car elle est en adéquation avec notre résultat obtenu précédemment chez le hamster syrien et aussi avec celui obtenu chez le rat (Sumova *et al.*, 2003). Il est probable que le niveau de protéine CLOCK soit affecté, ce qui devra être confirmé expérimentalement. Les gènes *Per2*, *Rev-erba* et *Avp*, sous contrôle du dimère CLOCK/BMAL1 (Jin *et al.*, 1999 ; Preitner *et al.*, 2002 ; Yoo *et al.*, 2005), présentent des niveaux d'ARNm diminués en SP. Cet effet pourrait être une conséquence directe d'une **diminution de la transactivation due à CLOCK/BMAL1**, consécutive à la réduction des quantités de leurs ARNm. En considérant la diminution d'amplitude du pic d'ARNm de *Per2*, il est possible que les quantités de PER2 soient également réduites en SP. Les niveaux de *Rev-erba* sont également diminués. Ainsi, le contrôle de l'expression de *Bmall* directement par REV-ERB α (inhibition) et indirectement pas PER2 (activation) pourrait être considérablement affecté et il en résulterait l'absence de rythmicité de la transcription de *Bmall* observée en SP.

Cette étude révèle donc une adaptation des SCN du hamster d'Europe à la photopériode et les effets obtenus sont globalement en accord avec ceux décrits chez le mouton, le hamster syrien, le rat et le hamster sibérien. L'horloge moléculaire des SCN est ainsi directement sensible à la longueur du jour. De plus, les altérations photopériodiques des ARNm de *l'Avp* (en accord avec les résultats chez le rat : *Jac et al.*, 2000), si traduits en niveaux de peptides AVP, pourraient jouer un rôle important dans la transmission de l'information photopériodique aux cibles majeures des SCN, comme les noyaux paraventriculaires (*Buijs & Kalsbeek*, 2001 ; *Perreau-Lenz et al.*, 2004).

Deux fonctions rythmiques, contrôlées par les SCN, bien connues, à savoir la sécrétion de mélatonine et l'activité locomotrice, dépendent de la photopériode. A l'inverse de la mélatonine, fortement réduite en LP (environ 70% pour la durée et 80% pour l'amplitude), l'activité locomotrice est plus soutenue en LP qu'en SP. On peut émettre l'hypothèse que ces effets opposés peuvent résulter d'un contrôle sélectif par les SCN. Nous savons que les SCN d'un point de vue neurochimique mais aussi fonctionnel ne sont pas à considérer comme un seul grand et même ensemble. Ainsi, une sous-population neuronale fonctionnelle des SCN pourrait réguler sélectivement la production de mélatonine alors qu'une autre sous-population fonctionnelle serait impliquée dans le contrôle de l'activité locomotrice. Dans le cas du contrôle de la mélatonine, plusieurs sous-populations (activatrice et inhibitrice) pourraient entrer en jeu (*Perreau-Lenz et al.*, 2005). Ainsi, les SCN, ou plutôt des sous-régionalisations des SCN, contrôleraient spécifiquement une ou plusieurs sorties et, d'un point de vue photopériodique, **les modifications du signal circadien pourraient être fonction de la sous-régionalisation concernée**. En ce qui concerne le contrôle de l'activité locomotrice, un rôle pour la libération par les SCN de $TGF\alpha$ a été évoqué chez la souris. Comme les neurones à $TGF\alpha$ n'expriment pas l'AVP (*van der Zee et al.*, 2005), une sous-régionalisation fonctionnelle pour le codage de la photopériode pourrait ainsi être mise en évidence. Il serait donc intéressant de savoir comment la synthèse du $TGF\alpha$ évolue au cours des saisons. Avant de le caractériser, une étude pour confirmer l'implication du $TGF\alpha$ est cependant nécessaire (voir remarques [paragraphe A.1.2.7.2.](#)).

En conclusion, nous avons montré que l'expression des gènes horloges et d'un gène contrôlé par l'horloge est dépendante de la photopériode dans les SCN du hamster d'Europe. Dans les SCN, les gènes *Clock* et *Bmal1* seraient les éléments essentiels à ces adaptations. Les

variations du fonctionnement journalier des boucles de régulation et de l'expression des CCG en fonction de diverses sous-régions des SCN pourraient être à la base des effets différentiels observés, en conditions naturelles, sur les variations de production hormonale (i.e. mélatonine) et sur les adaptations comportementales (i.e. activité locomotrice).

2. Mécanismes d'intégration de la photopériode par les gènes de l'Horloge.

Dans la première partie des résultats, nous avons vu que les variations journalières de l'expression des gènes horloges sont fonction de la photopériode. Ces études effectuées dans deux conditions environnementales stables, ne mettent pas en évidence comment l'expression des gènes horloges est entraînée par la photopériode. Le mécanisme de l'intégration, c'est à dire le(s) moyen(s) par le(s)quel(s) la photopériode est intégrée par les SCN et ceux permettant les variations des CCG restent en suspens. Comme le gène *Per2* est directement activé par la lumière, contrairement aux gènes *Per3* et *Clock*, l'ajustement photopériodique de son expression pourrait précéder ceux de *Clock* et de *Per3*. Dans le but de le mettre en évidence, nous avons voulu (1) mieux caractériser l'effet de la photopériode sur les SCN en réalisant le décours temporel de l'effet d'un changement de photopériode sur l'expression des gènes horloges et des CCG. De plus, dans leur fonctionnement saisonnier, les SCN peuvent être affectés directement par la photopériode, mais aussi par rétrocontrôle des hormones produites sous le contrôle des SCN. Ainsi, nous avons voulu savoir (2) si la mélatonine peut exercer un rétrocontrôle sur le fonctionnement moléculaire des SCN et ainsi participer à l'intégration d'une nouvelle photopériode.

2.1. EFFETS D'UN CHANGEMENT DE PHOTOPERIODE.

2.1.1. Introduction.

Au cours de ces cinq dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le fait que l'expression des gènes horloges est fonction de la photopériode tant au niveau des ARNm qu'au niveau protéique, chez le hamster syrien (Johnston *et al.*, 2005 ; Carr *et al.*, 2003 ; de la Iglesia *et al.*, 2004), le hamster sibérien (Messenger *et al.*, 2000), la souris (Steinlechner *et al.*, 2002), le mouton (Lincoln *et al.*, 2002) et le rat (Sumova *et al.*, 2003). La question qui s'est posée est de déterminer comment la photopériode est intégrée en terme d'expression des gènes horloges dans les SCN et si cette intégration peut être à la base de la construction de messages saisonniers via les gènes de sortie de l'horloge. Si les variations photopériodiques de l'expression des gènes horloges dans les SCN sont bien un reflet de la construction d'un message saisonnier, ces variations doivent alors précéder les variations des gènes de sortie de

l'horloge et celles de gènes spécifiques dans les tissus cibles des SCN. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le décours temporel d'ajustement à une nouvelle photopériode, des gènes horloges et de sortie de l'horloge dans les SCN et du gène *Aa-nat* dans la glande pinéale. Nous avons également étendu notre recherche à la condition physiologique encore peu élucidée de photopériode courte réfractaire (SP-R). Chez le hamster syrien, cet état se manifeste si les animaux restent longtemps en SP, soit environ 20 semaines. Une restauration spontanée des physiologies printanières comme la reprise de la reproduction est alors observée, bien que les durées de nuit et de pic de mélatonine soient toujours de type SP (voir [chapitre A.2.5](#)).

Aussi, les animaux ont tous été placés pendant 5 semaines en LP16:8. Dans un premier groupe, des animaux ont été sacrifiés toutes les quatre heures pendant 24h (groupe LP acclimaté, LPacc). Les autres animaux ont été transférés en SP8:16 pendant 4jours (groupe SP4d), 21 jours (groupe SP21d), 8 semaines (groupe SP acclimaté, SPacc) ou 26 semaines (groupe SP-R). Et, le même protocole de prélèvements a été répété lors du sacrifice de tous ces animaux. La mise en évidence des ARNm dans les SCN de gènes horloges, de CCG et, dans la glande pinéale, de l' *Aa-nat* a été effectuée par hybridation *in situ*.

2.1.2. Résultats.

Par mesure de la masse des testicules, nous avons pu vérifier chez tous les animaux de notre étude, que la SP induit bien une réduction de cette activité sexuelle, qui après un délai de 26 semaines (SP-R) présente une reprise spontanée (voir [figure 45](#)).

2.1.2.1. Effet direct de la photopériode.

Un exemple représentatif de maximum et de minimum de marquages obtenus pour chaque gène en SPacc est donné [figure 46](#). L'expression de l'ensemble des gènes étudiés est rythmique dans chaque condition (LPacc, SP4d, SP21d et SPacc), sauf pour le gène *Clock*. L'ensemble des profils est présenté [figure 47](#). Le ZT0 a été choisi comme étant l'apparition du jour et a été pris comme temps de référence pour comparer les photopériodes. Les différences entre les photopériodes SPacc et, soit LPacc, soit SP4d ou soit SP21d, en termes de durée, d'amplitude, de niveau basal et de décalages de phase (au temps de demi-montée) ont été recherchées et sont présentées comme valeur calculée \pm SEM. Les résultats de

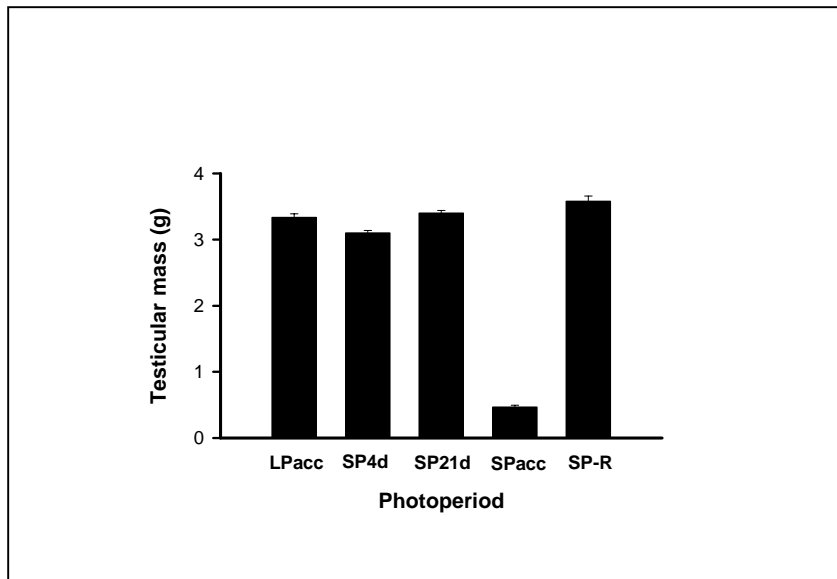


Figure 45 : La taille des testicules évolue en fonction de la photopériode chez le hamster syrien.

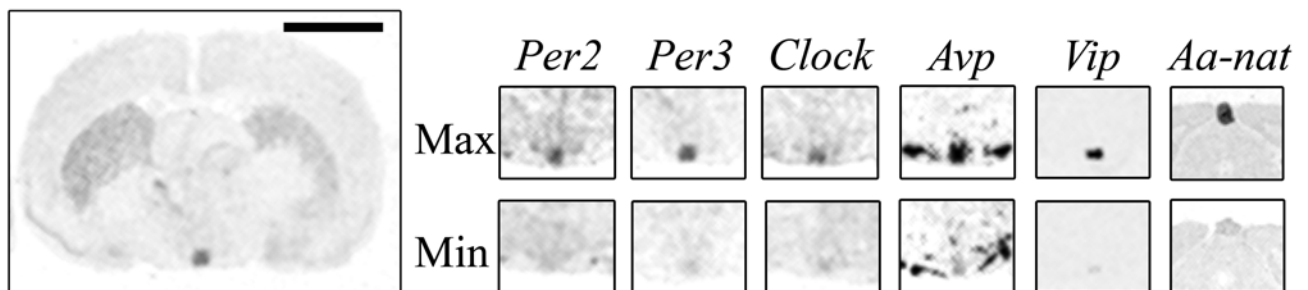


Figure 46 : Exemple de marquage pour les différents gènes étudiés en SPacc dans les SCN et dans la glande pinéale.

A gauche, un exemple de marquage sur une coupe coronale entière, après hybridation avec une sonde *Per3*. La barre noire représente 0.5cm. A droite, pour chaque gène, deux exemples sont donnés, correspondant au maximum (Max) et au minimum (Min) de marquage obtenu en SPacc.

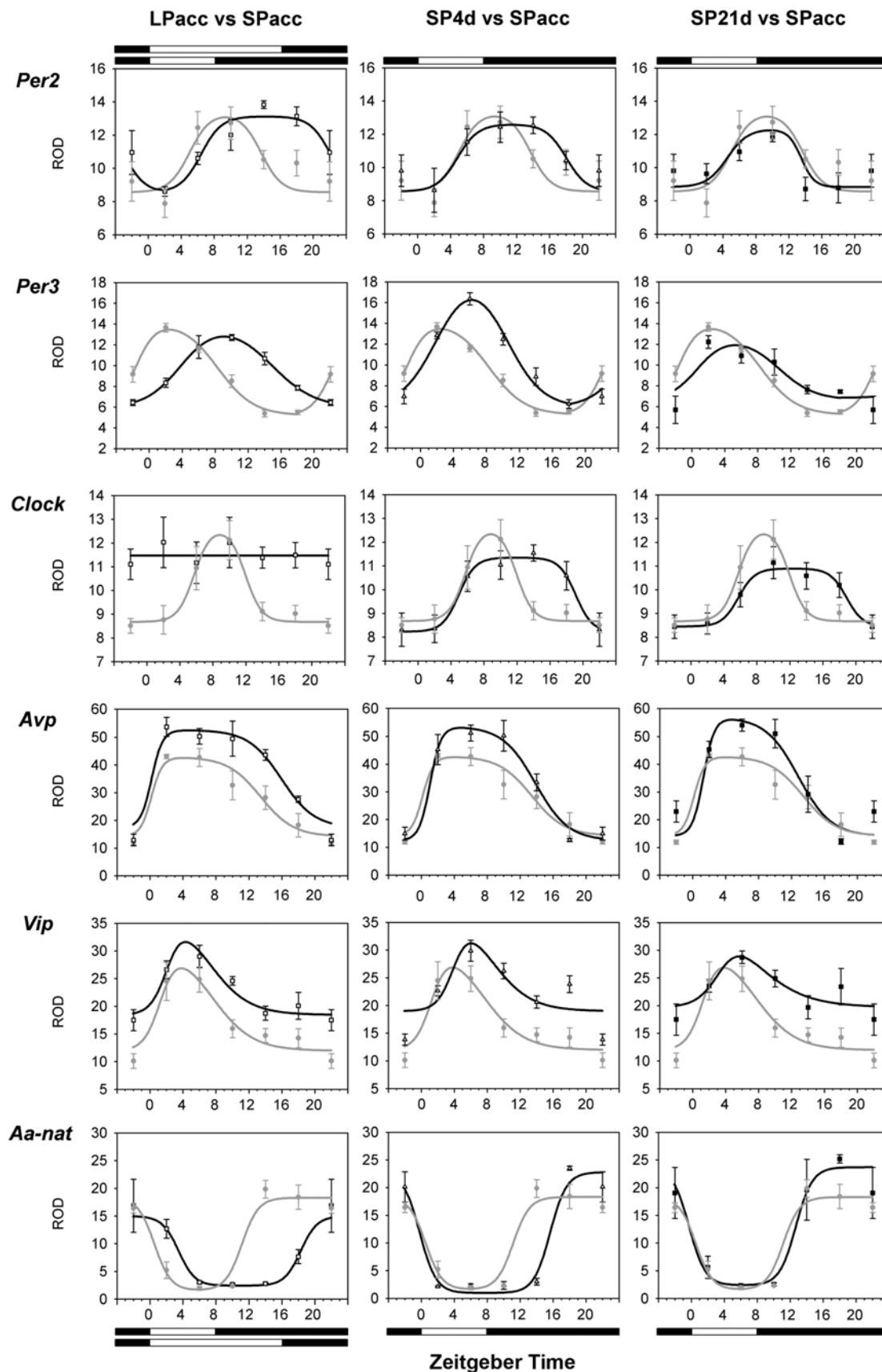


Figure 47 : L'expression de gènes dans les SCN et dans la glande pinéale est fonction des conditions photopériodiques chez le hamster syrien.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de données brutes et de modélisation, pour chaque gène et dans chaque photopériode. SPacc, courbe grise et ronds gris; LPacc : carrée blanc; SP4d, triangles blancs; SP21d, carrés noirs. ROD : relative optical density.

l'ANOVA à un et à deux facteurs (F test) sont vérifiés comme suit : ***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$.

L'expression de ***Per2*** présente un maximum vers ZT11-18 en LPacc et à ZT 9 en SPacc. La photopériode a une influence sur la durée du pic d'expression : une diminution de $8.26\text{h} \pm 1.29$ *** est observée en SPacc par rapport à LPacc. Par comparaison avec la condition SP4d, le profil du pic d'expression de *Per2*, en SPacc, est réduit en durée de $3.75\text{h} \pm 1.44$ *. Aucune différence significative n'est observée entre les pics obtenus en SPacc et en SP21d (ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$).

Dans le cas du gène ***Per3***, un pic de présence d'ARNm est observable en LPacc (à ZT9) comme en SPacc (à ZT2). La durée du pic est influencée par la photopériode avec, en SPacc, une réduction de durée de $3.23\text{h} \pm 1.26$ * et une avance de phase du moment de demi-montée de $5.82\text{h} \pm 0.91$ ***, par rapport à LPacc. En SPacc, le pic est de durée inférieure à celle du pic obtenu en SP4d ($-4.45\text{h} \pm 1.60$ **) et en avance de phase ($-2.39\text{h} \pm 1.17$ *). En revanche, le pic obtenu en SPacc n'est pas significativement différent de celui obtenu en SP21d (ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$).

Le gène ***Clock***, d'expression constitutive en LPacc (moyenne : $11.47 \text{ ROD} \pm 0.48$) présente un rythme d'expression en SPacc. Ce rythme montre des valeurs plus faibles de ZT15 à ZT2. En SP4d et en SP21d, la présence des ARNm de *Clock* est rythmique avec des valeurs plus faibles de ZT22 à ZT2, les pics ne sont pas significativement différents (ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$). En SPacc, il y a une différence de durée de bathyphase de $+5.70\text{h} \pm 1.14$ *** et de $+5.26\text{h} \pm 1.26$ ***, par rapport à SP4d et à SP21d, respectivement.

Le profil rythmique du gène ***Avp*** avec un maximum vers ZT2-10 en SPacc présente une diminution d'amplitude ($-26.39\% \pm 9.69$ **) et de durée d'expression ($-3.51\text{h} \pm 1.38$ *) par rapport au pic obtenu en LPacc, qui se situe de ZT2 à ZT14. Par rapport au pic obtenu en SP4d, celui en SPacc est diminué en terme d'amplitude ($-23.66\% \pm 8.25$ **) mais pas de durée ($p > 0.05$). Enfin, par rapport à celui observé en SP21d, le pic d'ARNm en SPacc est réduit uniquement en amplitude ($-29.01\% \pm 10.38$ **).

Concernant l'expression du gène ***Vip***, elle est rythmique en LPacc comme en SPacc, avec des maximum obtenus à ZT4 dans les deux cas. La photopériode influe sur l'expression de ce

gène avec une réduction du niveau de base en SPacc de $-31.36\% \pm 5.27^{***}$ par rapport à LPacc, de $-32.45\% \pm 5.71^{***}$ par rapport à SP4d et $-32.45\% \pm 5.71^{***}$ par rapport à SP21d. De plus, la phase du pic (vue au temps de demi-montée) est en avance en SPacc de $-1.81h \pm 0.80^*$ et de $-1.26h \pm 0.85^*$ par rapport aux conditions SP4d et SP21d, respectivement.

Au sein de la glande pinéale, l'expression de l'*Aa-nat* est maximale tout au long de la nuit, en LPacc comme en SPacc. Le pic en SPacc est augmenté en durée ($5.31h \pm 1.97^{**}$) par rapport au pic en LPacc et par rapport à SP4d ($3.4h \pm 1.51^*$) mais n'est pas différent de celui en SP21d.

2.1.2.2. La photopériode courte réfractaire.

Les données obtenues en photopériode courte réfractaire ou SP-R sont comparées à celles en SPacc et représentées, comme valeur calculée \pm SEM, [figure 48](#). Dans tous les cas, l'expression des gènes horloges est rythmique (ANOVA à un facteur), à l'exclusion de *Clock* en SP-R.

Dans le cas des gènes *Per2*, *Per3*, *Avp*, *Vip* et *Aa-nat*, aucune différence significative n'est observée entre les conditions SPacc et SP-R (ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$).

Dans le cas du gène *Clock*, la SP-R a une influence nette sur son expression qui devient non rythmique (ANOVA à un facteur, $p > 0.05$; moyenne d'expression : $9.06 \text{ ROD} \pm 0.13$), alors qu'elle était rythmique en SPacc.

2.1.2.3. *Clock* "au cours des saisons".

En LP comme en SP-R, l'expression de *Clock* est non rythmique, contrairement aux situations SP4d, SP21d et SPacc. Les états LP et SP-R ne sont pas équivalents puisqu'en SP-R le niveau moyen est diminué de $21\% \pm 0.13$ (effet de la photopériode, ANOVA à deux facteurs). En considérant les points horaires ZT10, 14 et 22, on remarque que la diminution des niveaux d'ARNm de LPacc à SP-R ne s'effectue pas de façon homogène au cours du temps ([figure 49](#)). En effet, la réduction à ZT22 apparaît dès SP4d, celle à ZT14 en SPacc et celle à ZT10 uniquement en SP-R (ANOVA à deux facteurs).

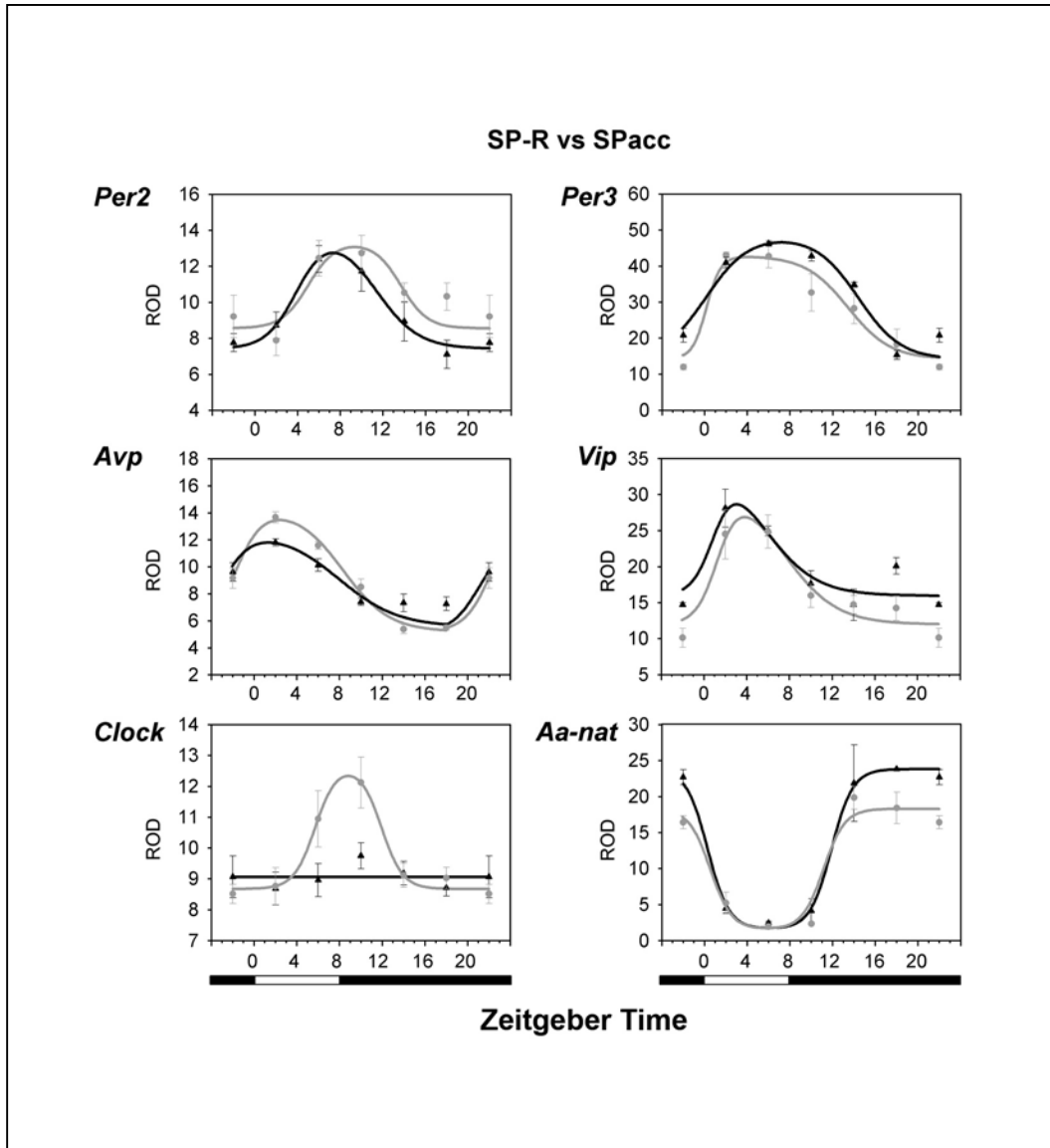


Figure 48 : Comparaison des profils d'expression de différents gènes dans les SCN et la glande pinéale entre la SP-R et la SPacc.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de données brutes et de modélisation, pour chaque gène et dans chaque photopériode. SPacc, courbe grise et ronds gris; SP-R, triangles et courbes noirs. ROD : relative optical density.

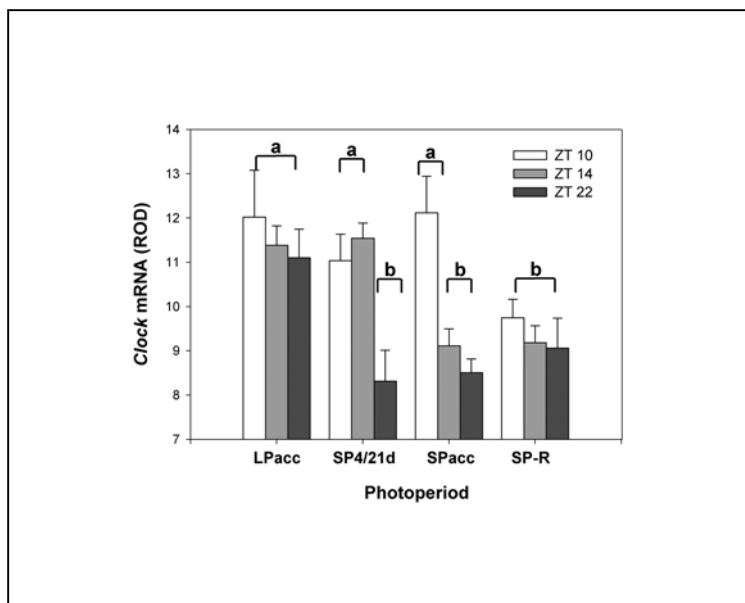


Figure 49 : Evolution des niveaux d'ARNm de *Clock* à ZT10, 14 et 22 en fonction du temps passé en SP.

Les lettres a et b représentent des groupes significativement différents. ROD : relative optical density.

Gene	Effect	SPacc is compared to			
		LP	SP 4d	SP 21d	SP-R
Per2	Peak duration	-8.26h ±1.29***	-3.75h ±1.44*	n.s.	n.s.
Per3	Peak duration	-5.82h ±0.91***	-2.39h ±1.17*	n.s.	n.s.
	Phase advance	-3.23h ±1.26*	-4.45h ±1.60**	n.s.	n.s.
Clock	Basal level duration	high-level	+5.70h ±1.14***	+5.26h ±1.26***	low-level
Avp	Peak duration	-3.51h ±1.38*	n.s.	n.s.	n.s.
	Amplitude	-26.39% ±9.69**	-23.66% ±8.25**	-29.01% ±10.38**	n.s.
Vip	Basal level	-31.36% ±5.27***	-32.45% ±5.71***	-32.45% ±5.71***	n.s.
	Phase advance	n.s.	-1.81h ±0.80*	-1.26h ±0.85*	n.s.
Aa-nat	Peak duration	+5.31h ±1.97**	+3.4h ±1.51*		

* 0.05 ; ** 0.01 ; *** 0.001

Figure 50 : Résumé des effets observés.

L'ensemble des effets quantifiés est présenté sous forme d'un tableau, [figure 50](#).

Cette étude est en cours de rédaction pour publication (article en préparation n°2).

2.1.3. Discussion.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'adaptation de l'expression des gènes suite au transfert des animaux dans une nouvelle photopériode, qui est réduite de 8h, nécessite un délai supérieur à 4 jours en terme d'expression des gènes horloges *Per2* et *Per3* et, un délai supérieur à 21 jours en terme d'expression des gènes de sortie de l'horloge *Avp* et *Vip*. Les SCN contrôlent le rythme journalier de sécrétion de mélatonine par la glande pinéale. La durée de cette libération dépend également de la photopériode et nous montrons qu'en terme d'expression de l'*Aa-nat*, le codage de la photopériode par la glande pinéale demande environ 21 jours. Enfin, nous montrons que l'expression du gène *Clock* dans les SCN, est variable en fonction de la photopériode environnante et aussi, contrairement aux autres gènes étudiés, en fonction du temps passé en SP.

Au regard de l'expression de *Aa-nat* dans la glande pinéale, on remarque qu'en SP4d, son expression est déjà augmentée par rapport à LPacc mais sans pour autant, être déjà de type SPacc. Et, comme cette expression n'est pas encore stimulée en début de nuit, la mélatonine n'est pas libérée à ce moment. Or, la mélatonine a une action sur l'activité électrique des neurones des SCN *in vitro*, uniquement si elle est appliquée en fin de jour (Shibata *et al.*, 1989 ; Stehle *et al.*, 1989 ; McArthur *et al.*, 1991, 1997 ; Liu *et al.*, 1997a). *In vivo*, une augmentation (par injection de mélatonine exogène) ou une diminution (par pinéalectomie ou cycle LL) des quantités de mélatonine, ne provoquent pas de variations de la sensibilité à la lumière des SCN (en terme d'expression de *c-fos*, Sumova *et al.*, 1995a, b ; Sumova & Illnerova., 1996 ; Jacob *et al.*, 1997) ni de l'expression des gènes de l'horloge (nos résultats, [chapitre D.2.2.](#), Messenger *et al.*, 2001 ; Poirel *et al.*, 2003). Ainsi, l'effet observé en SP4d concernant l'expression de l'ensemble des gènes étudiés, ne peut être dû à une action rétrocontrôle de la mélatonine sur les SCN.

L'expression des gènes horloges au sein des SCN, dépend de la photopériode. Il a principalement été rapporté que l'expression des *Pers* varie en parallèle avec la durée du jour (nos deux premières études, Messenger *et al.*, 2000 ; Lincoln *et al.*, 2002 ; Steinlechner *et al.*,

2002 ; Carr *et al.*, 2003 ; Sumova *et al.*, 2003 ; de la Iglesia *et al.*, 2004 ; Johnston *et al.*, 2005) et toutes ces études comparent deux états stables (LPacc et SPacc). Mais, aucune des ces études ne permet de conclure quant à la vitesse des modifications, induites par la photopériode, des boucles moléculaires ni si cette intégration dépend exclusivement de la photopériode. Ici, nous montrons que l'expression des gènes horloges *Per2* et *Per3* présente une diminution de durée et, pour *Per3*, une avance de phase au temps de demi-montée en SP8:16acc par rapport à LP16:8acc, confirmant ainsi nos données précédemment obtenues en SP10:14acc vs LP14:10acc. On peut d'ailleurs noter que les différences sont d'autant plus importantes que la variation de la photopériode est importante (pour *Per2*, $8.26h \pm 1.29^{***}$ pour un écart photopériodique de 8 heures et $3h59 \pm 0h43^{***}$ pour un écart de 4 heures, et, pour *Per3*, $5.82 \pm 0.91^{***}$ dans cette étude et $3h06 \pm 1h01^{**}$ entre SP10:14acc et LP14:10acc). Ainsi, l'expression des gènes *Per2* et *Per3* est bien fonction de la valeur de la photopériode, contrairement à la durée du pic d'activité électrique qui ne semble pas être différente entre deux photopériodes courtes (Mrugala *et al.*, 2000). Un changement de photopériode de LP16:8 vers SP8:16 induit une modification des expressions de *Per2* et de *Per3*, rapidement initiées mais qui cependant ne sont pas totalement de type SPacc en SP4d. Ce n'est qu'en SP21d que ces expressions sont de type SPacc. La boucle moléculaire négative, dont les gènes *Per2* et *Per3* font partie, acquiert donc un profil de type SPacc, après un délai compris entre 4 et 21 jours de SP.

Les gènes *Vip* et *Avp* présentent une expression journalière rythmique, avec un maximum d'expression pendant le jour, dépendante de la photopériode. Ces résultats confirment des données antérieures chez d'autres espèces de hamster (européen et sibérien, *Avp* : nos résultats [chapitre D.1.2.](#) ; Duncan *et al.*, 1995 ; Johnston *et al.*, 2005 et sibérien, *Vip* : Duncan *et al.*, 1995). En SP4d, l'expression est modifiée par rapport à LPacc et SPacc. Ainsi, comme dans le cas des gènes *Pers*, ces variations d'expression de *Vip* et d'*Avp* semblent dues au changement de photopériode. En SP21d, ces rythmes ne sont pas encore de type SPacc alors que celui de l'*Aa-nat* et donc de la mélatonine, sont déjà de type SPacc. On pourrait donc penser que la mélatonine participe à la diminution des niveaux d'ARNm de l'*Avp* (amplitude) et du *Vip* (niveau basal) entre les conditions SP21d et SPacc. Cependant, chez le hamster sibérien, une pinéalectomie n'empêche pas la diminution des niveaux d'ARNm de l'*Avp* et du *Vip* provoquée par une SP (Duncan, 1998). De plus, chez le rat, une injection unique de mélatonine est sans effet sur l'expression de l'*Avp* (Poirel *et al.*, 2003). Ainsi, bien que notre

étude ne le démontre pas formellement, l'intégration de la SPacc, en terme d'expression des gènes *Avp* et *Vip*, semble être entièrement due au changement de photopériode.

Les dimères CLOCK/BMAL1 permettent l'augmentation de la transcription des gènes présentant des E-box dans leur promoteur (voir [chapitre A.1.3.](#) et pour revues, Reppert & Weaver, 2002 ; Hardin, 2004). Et, les gènes *Per2*, *Per3*, *Vip* et *Avp* contiennent tous des E-box dans leur promoteur (souris : *mPer2* : Yoo *et al.*, 2005 ; *mPer3* : Travnickova-Bendova *et al.*, 2002 ; *mAvp* : Jin *et al.*, 1999 et homme, *hVip* : Hahm & Eiden, 1998). *In vitro*, la régulation transcriptionnelle de tous ces gènes, par le dimère CLOCK/BMAL1, a été démontrée, sauf dans le cas du gène *Vip*. Pour ce gène, la preuve directe n'est pas encore formelle mais les souris *Clock*^{-/-} montrent une immunoréactivité au VIP dans les SCN, réduite par rapport aux souris sauvages (Herzog *et al.*, 2000). Les différents effets observés en SP4d, globalement inhibiteurs, pourraient donc être dus à une baisse de la transactivation par le dimère CLOCK/BMAL1. Or, en SP4d, l'expression de *Clock* diminue spécifiquement de ZT15 à ZT2. Il est donc probable que cette diminution induise une diminution de CLOCK en phase avec l'activité transcriptionnelle des gènes *Pers*, *Avp* et *Vip* ce qui aurait pour conséquence cette diminution globale de leur expression déjà observée dès SP4d. La différence de délai d'intégration entre les gènes horloges *Per2-3* et les gènes *Avp* et *Vip* peut s'expliquer par la présence de contrôle différentiel au niveau du promoteur. Il a été montré que l'activité d'une E-box peut varier et notamment dans le cas du promoteur de *Per2* où la présence d'une E-box-like permet une transactivation plus importante qu'une E-box classique (Akashi *et al.*, 2006). De plus, le nombre d'E-box ou d'E-box-like diffère entre ces gènes. D'autres sites promoteurs pourraient également intervenir dans l'intégration de la photopériode. Par exemple, le promoteur de *Per2* n'est pas sous le contrôle exclusif de CLOCK/BMAL1, il possède dans son promoteur des éléments de réponse à CREB et à DBP/E4BP4 (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002 ; Akashi *et al.*, 2006). Ainsi, la différence de délai d'intégration de la photopériode observé entre gènes horloges (*Per2-3*) et gènes de sortie de l'horloge (*Avp*, *Vip*), pourrait s'expliquer par une variabilité d'efficacité du dimère CLOCK/BMAL1 et, par la présence d'autres facteurs activateurs/inhibiteurs de la transcription.

Ainsi, suite au transfert des animaux dans une nouvelle photopériode, réduite de 8h, **les SCN intègrent cette nouvelle photopériode d'une façon rapide en terme d'expression des gènes *Per2-3* et lente en terme d'expression des gènes de sortie de l'horloge, *Avp* et *Vip*. Il semble donc que les SCN construisent un message photopériodique.** L'importante

réactivité du cœur de l'horloge moléculaire pourrait refléter une capacité d'adaptation, jour après jour, des boucles de régulation, en conditions naturelles. A l'inverse, l'intégration plus lente et progressive des sorties de l'horloge permettrait la mise en place d'une réponse insensible aux petites fluctuations de l'environnement, sans signification physiologique saisonnière.

Dans cette étude, nous avons également suivi le profil journalier de ces gènes lorsque les animaux présentent un état photoréfractaire à la SP. Dans cette condition, nous montrons que dans les SCN, les gènes horloges *Per2* et *Per3*, les gènes de sortie de l'horloge *Vip* et *Avp*, et dans la pinéale, le gène *Aa-nat*, ne présentent pas une expression différente entre SPacc et SP-R. Ces résultats confirment ceux obtenus chez les hamsters sibérien et syrien, pour l'expression du gène *Per1* dans les SCN, et, indirectement, pour le taux circulant de mélatonine (Carr *et al.*, 2003 ; Johnston *et al.*, 2003). Notre étude décrit pour la première fois le profil journalier du gène *Clock* en condition SP-R. Nous observons une différence d'expression entre les conditions SPacc et SP-R. Plus globalement, l'expression de *Clock* présente une corrélation avec l'état d'activité sexuelle des animaux (actifs, inhibés ou en cours de restauration spontanée, voir [figure 45](#)). La présence des ARNm de *Clock* est toujours élevée en LPacc, rythmique en SPacc avec apparition de valeurs plus basses et toujours faibles en SP-R. Le transfert des animaux de LPacc à SP induit une diminution de la transcription de *Clock* qui s'effectue tout d'abord rapidement puis très lentement. En effet en SP4d, l'expression de *Clock* suit déjà un profil rythmique par apparition de valeurs faibles de ZT22 à ZT2. En revanche, en SP21d, le profil est toujours le même. En SPacc, la bathyphase du pic est élargie et s'étend alors de ZT15 à ZT2. Enfin, les niveaux d'ARNm de *Clock* mesurés de ZT2 à ZT15, toujours élevés en SPacc, deviennent également de type basal en SP-R ([figures 47, 48 et 49](#)). L'expression de *Per2* et de *Per3* comme celle de l'*Avp* et du *Vip*, n'est cependant pas affectée par la SP-R. Or, entre la SPacc et la SP-R, les niveaux diminuant de *Clock* concernent la tranche horaire ZT2-15, ce qui, avec le temps de traduction, ne semblent pas être en phase avec la transactivation de ces gènes. Ainsi, les niveaux diminués de *Clock* de ZT22 à ZT2 seraient à la base de la diminution d'expression des autres gènes étudiés ici et, la diminution d'expression de *Clock* de ZT2 à ZT15, pourrait spécifiquement réguler l'expression d'autres gènes qui, par un mécanisme encore non élucidé, permettrait de coder la SP-R.

2.2. ROLE DE LA MELATONINE SUR LES SCN.

2.2.1. Introduction.

L'horloge circadienne principale dans les SCN, intègre donc les variations de photopériode et permettrait également la distribution de messages circadiens dépendants de la photopériode. Ces messages sont ensuite lus et interprétés par des tissus cibles qui présentent alors une physiologie adaptée. Le tissu le plus étudié est la glande pinéale dont la libération de mélatonine s'effectue uniquement pendant la phase nocturne du nyctémère et pendant une durée dépendante de la longueur de la nuit. La mélatonine agit alors sur différents tissus cibles qui, comme la *Pars tubéralis* de l'hypophyse, présenteront à leur tour un fonctionnement adapté aux variations de saisons (Lincoln *et al.*, 2003a, b, c). Le(s) mécanisme(s) d'action de la mélatonine reste(nt) encore très peu élucidé(s) mais la présence de récepteurs sur certains tissus laissent supposer une action directe de la mélatonine sur ces tissus. Parmi eux, il y a les SCN eux-mêmes et il est probable que la mélatonine agisse en "feed-back" sur les SCN. Des études préliminaires ont démontré que la mélatonine permet d'entraîner les rythmes d'activité locomotrice et de prise de boisson des animaux (Redman *et al.*, 1983 ; Thomas & Armstrong, 1988 ; Cassone, 1990 ; Pitrosky *et al.*, 1999) mais pas directement l'expression des gènes de l'horloge chez le rat, espèce dont la physiologie est peu dépendante des saisons (Poirel *et al.*, 2003). Dans cette étude, nous avons voulu déterminer si la mélatonine exogène pouvait influencer la transcription des gènes horloges dans les SCN d'une espèce photopériodique, le mouton Soay. Cette étude a été effectuée à Aberdeen dans le laboratoire du Dr David Hazlerigg et avec la collaboration du laboratoire du Dr Gérard Lincoln à Edimbourg. Afin d'éliminer la mélatonine endogène, les animaux ont été placés en lumière constante, le jour de la manipulation. La moitié des animaux a reçu une injection de mélatonine 3 heures avant prélèvement et ceci tout au long des 24 heures. Les prélèvements de 4 animaux par point horaire sont effectués toutes les 4 heures. L'autre moitié a reçu une injection ne contenant pas de mélatonine, formant ainsi le groupe témoin de l'expérience.

2.2.2. Résultats.

Les animaux sont élevés en conditions LP16:8 et ont été placés en lumière constante le jour de l'expérience. Bien que dans ce cas, une condition constante d'éclairement est appliquée au

animaux, les résultats sont présentés relativement au ZT0 définissant l'arrivée du jour en cycle LD et au projeté supposé en LL.

A ZT16, la lumière reste allumée jusqu'en fin d'expérience.

L'expression des gènes horloges *Per1*, *Per2*, *Cry1* et *Bmal1* est rythmique dans les SCN, tout au long des 24 heures, dans les deux groupes expérimentaux ([figure 51](#), $p < 0.001$, ANOVA à un facteur). Les gènes *Per1*, *Per2*, *Cry1* et *Bmal1* présentent un pic d'ARNm à ZT4-8, 16, 16 et 20 respectivement. La mélatonine n'a aucun effet significatif sur l'expression de chacun de ces gènes ($p > 0.05$, ANOVA à deux facteurs, effet du traitement).

L'expression rythmique de *Rev-erb α* révèle un pic à ZT0-4 pour le groupe contrôle et un pic à ZT4 pour le groupe mélatonine ([figure 51](#)). La mélatonine présente un effet inhibiteur significatif sur l'expression de *Rev-erb α* ($p = 0.05$, ANOVA à deux facteurs) mais cet effet n'apparaît pas dépendant du temps ($p > 0.05$, ANOVA à deux facteurs, interaction temps*traitement).

Ce travail représente la première partie de la publication dans [Endocrinology en 2006](#).

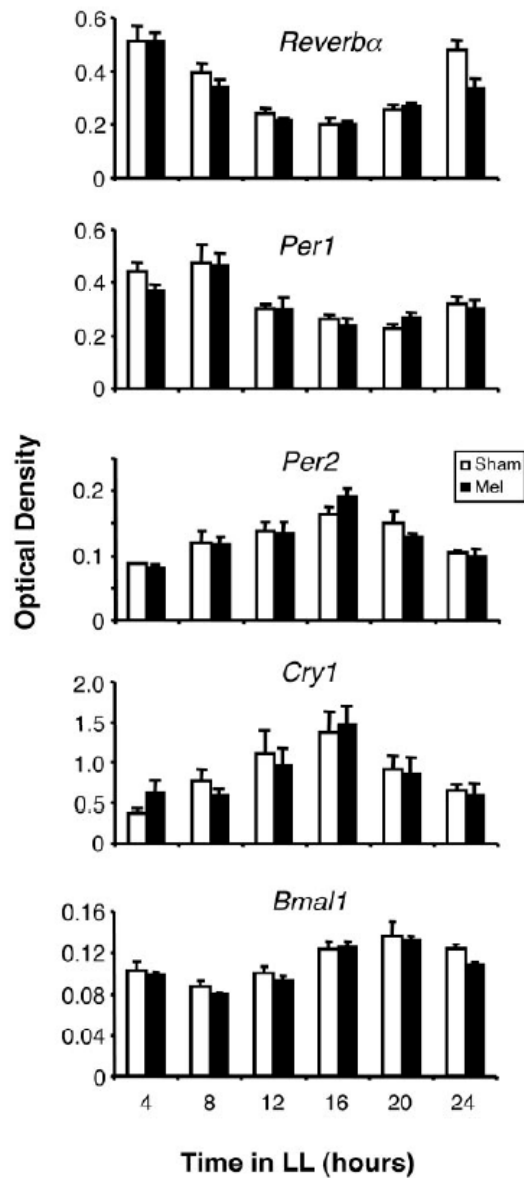


Figure 51 : La mélatonine n'affecte pas directement l'expression des gènes horloges dans les SCN du mouton Soay.

Niveaux journaliers d'ARNm des gènes horloges exprimés en densité optique et déterminés par hybridation *in situ* radioactive. Les animaux sont élevés en LP et sont placés en LL le jour de l'expérience. Durant cette période, les animaux reçoivent une injection saline ou de mélatonine toutes les 4 heures et sont sacrifiés 3 heures après injection. Les barres blanches représentent le groupe injecté-salin et les barres noires, le groupe injecté-mélatonine. Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux.

2.2.3. Discussion.

La mélatonine influence le fonctionnement même des SCN. Une administration de mélatonine exogène permet de synchroniser le comportement rythmique circadien chez les rongeurs et chez l'homme (Redman *et al.*, 1983 ; Grosse *et al.*, 1996 ; Slotten *et al.*, 1999 ; Arendt & Skene, 2005). Par ailleurs, son application sur des tranches de SCN provoque un décalage de phase de l'activité électrique des neurones, chez la souris (Gillette & McArthur, 1996). De plus, les mutants murins MT1 et MT2 ne présentent ni décalage de phase induit par la mélatonine ni variation de l'activité électrique des SCN (Liu *et al.*, 1997a ; Jin *et al.*, 2003). Il est donc possible que les effets circadiens de la mélatonine soient médiés par ses récepteurs localisés dans les SCN. Cependant, nous avons montré que l'injection de mélatonine a un effet rapide que sur un seul gène horloge, *Rev-erba*, et de plus, à un seul point horaire. Cet effet (diminution des niveaux d'ARNm de *Rev-erba* à ZT0) peut être dû à deux phénomènes : soit la mélatonine induit une inhibition du pic endogène d'ARNm de *Rev-erba*, soit elle provoque un retard de phase de ce pic. Une étude préliminaire réalisée au laboratoire a montré qu'une injection de mélatonine n'affecte pas l'expression des gènes horloges *Per1à3*, *Cry1* et *Bmal1* dans les SCN de rat, le jour même de l'injection (Poirel *et al.*, 2003). Il est donc probable que l'effet de la mélatonine dans les SCN ne soit pas dû à une action directe sur l'expression des gènes horloges. Des données plus récentes du laboratoire ont montré qu'une injection unique de mélatonine induit une augmentation rapide des niveaux d'ARNm de *Rorb*, sans effet sur *Rora*, dans les SCN de rat (Agez *et al.*, 2006a). Cet effet permettrait une avance de phase du pic d'ARNm de *Rev-erba* et, le cycle suivant, une avance de phase de celui de *Bmal1*. Ainsi, l'effet de la mélatonine sur les SCN s'effectuerait (1) rapidement au niveau de l'expression de différents gènes ne faisant pas partie des gènes horloges et, (2) ce premier effet aurait des conséquences sur l'expression des gènes horloges dans les SCN au moins 24h après l'injection de mélatonine. Certains effets restent cependant difficiles à expliquer. En effet, alors que le pic d'ARNm de *Rev-erba* présente une avance de phase chez le rat, nous avons montré chez le mouton que ce pic est soit diminué, soit en retard de phase. Il est possible que cet effet soit dépendant de l'espèce mais peut également trouver son origine dans le protocole utilisé. Chez le rat, l'avance de phase du pic observée en fin de nuit/début de jour intervient à la suite d'une injection unique de mélatonine réalisée en fin de jour et, chez le mouton, la diminution des quantités d'ARNm de *Rev-erba* à la transition

jour/nuit est due à une injection de mélatonine effectuée 3h avant. Au vue des ces résultats et de ceux obtenus dans l'étude du décours temporel d'ajustement à une nouvelle photopériode, il ne semble pas que la mélatonine présente une action sur la majorité des gènes horloges dans les SCN en ce qui concerne leurs adaptations photopériodiques. De plus, de nouvelles données montrent qu'une pinéalectomie n'affecte pas, à court comme à long terme, l'expression des gènes horloges dans les SCN (Agez *et al.*, 2006b).

Aussi, bien que les caractéristiques fines de l'action de la mélatonine sur l'horloge centrale ne soient pas encore clairement établies, il reste possible que la mélatonine puisse à long terme, modifier voire entraîner l'expression des gènes horloges et donc des rythmes physiologiques et comportementaux.

3. Contrôle de l'activité locomotrice par le TGF α .

3.1. INTRODUCTION.

Le rythme comportemental d'activité locomotrice est également affecté par la photopériode chez le hamster syrien (Hastings *et al.*, 1987) et surtout chez le hamster d'Europe (Wollnik *et al.*, 1991 ; Monecke & Wollnik, 2005). D'un point de vue circadien, l'existence d'un facteur diffusible sécrété par les SCN a été évoqué dans le contrôle de l'activité locomotrice. En effet, des animaux arythmiques après lésion des SCN retrouvent un rythme d'activité locomotrice s'ils reçoivent une greffe ICV de SCN. Or, cet effet du transplant est efficace même si le greffon est contenu dans une capsule empêchant toute innervation avec l'hôte (Silver *et al.*, 1996b). Plusieurs équipes ont proposé que ce facteur diffusible pourrait être le TGF α . Dans le SCN de la souris, un pic d'expression diurne de *Tgfa* est circadien et, l'injection de TGF α en ICV inhibe l'activité locomotrice de ces animaux nocturnes (Kramer *et al.*, 2001 ; Snodgrass-Belt *et al.*, 2005).

La caractérisation du profil photopériodique d'expression de *Tgfa* pourrait apporter un argument de plus quant au rôle du TGF α dans le contrôle de l'activité locomotrice. Cependant, nous avons voulu préalablement confirmer son implication journalière dans l'inhibition de l'activité locomotrice. Pour cela, nous avons comparé l'expression de *Tgfa* sur 24 heures, entre un rongeur diurne et un rongeur nocturne. Et, si les rythmes obtenus sont en opposition de phase entre un rongeur diurne et un nocturne, cela confirmera cette implication. *Arvicanthis ansorgei* est un rongeur à activité diurne (Challet *et al.*, 2002). Au laboratoire, il a été montré que les profils d'expression des gènes horloges dans les SCN de cette espèce sont identiques à ceux de la souris en terme de phase par rapport au cycle LD (Dardente *et al.*, 2002a ; Caldelas *et al.*, 2003), le cœur des mécanismes moléculaires à la base de la rythmicité semble donc identique entre ces deux espèces. Les neuropeptides exprimés dans les SCN sont pour la plupart régionalisés et nous avons vu qu'ils interviennent dans la formation de la rythmicité journalière (chapitres A.1.2.5. et A.1.3.1.3., Herzog *et al.*, 1998 ; Low-Zeddies & Takahashi, 2001 ; Welsh *et al.*, 1995). Nous avons donc également effectué une comparaison de l'expression des principaux neuropeptides des SCN entre ces deux espèces, afin de savoir d'une part, si leurs expressions (en termes de rythme, de phase ou encore de durée) ont une influence sur le caractère diurne ou nocturne des espèces. D'autre part, nous pourrions comparer ces expressions avec celles décrites chez le rat (voir chapitre A.1.2.2.) afin de savoir

si les caractéristiques des expressions des neuropeptides semblent généralisables à toutes les espèces de rongeurs nocturnes, ou alors si elles semblent spécifiques à chaque espèce. Par hybridation *in situ*, nous avons mis en évidence les profils journaliers et circadiens de l'*Avp*, du *Vip*, du *Grp* dans une première expérience, et du *Tgfa* dans une seconde.

3.2. RESULTATS.

L'activité locomotrice de roue a été enregistrée en conditions LD et DD pendant plusieurs jours afin de confirmer le caractère nocturne et diurne de ces espèces. Un enregistrement représentatif du comportement journalier et circadien, d'une souris et d'un rat roussard (*A. ansorgei*), est présenté [figure 52](#). La période d'activité de ces deux espèces est clairement entraînée à 24 heures au cours des cycles LD12:12 et, en DD, la période endogène est légèrement inférieure ou supérieure à 24 heures chez la souris et le rat *A. ansorgei*, respectivement.

3.2.1. Expressions journalière et circadienne de l'*Avp*, du *Vip* et du *Grp*.

Les souris *Mus musculus* et les rats *Arvicanthis ansorgei* sont maintenus en conditions d'éclairage LD12:12. La moitié des animaux reste en permanence dans ces conditions et l'autre moitié est transférée en DD pendant un jour avant les prélèvements. Dans ces conditions, quatre ou cinq animaux sont prélevés toutes les 4 heures pendant un cycle de 24 heures. Les prélèvements débutent à ZT0 et CT0, les temps CT correspondant aux ZT projetés.

Un exemple représentatif de marquage obtenu par hybridation *in situ* chez ces deux espèces et à deux temps circadiens, est présenté [figure 53](#). Les données brutes sont présentées comme valeur calculée \pm SEM sur la [figure 54](#). Les résultats de l'ANOVA à un (temps) et à deux facteurs (LD vs DD) sont vérifiés comme suit : ***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$. Des régressions non linéaires ont été réalisées lorsqu'un effet du temps a été détecté, dans le but de comparer par un test-t le moment de l'acrophase du pic d'expression d'un gène chez une espèce, entre les deux conditions lumineuses.

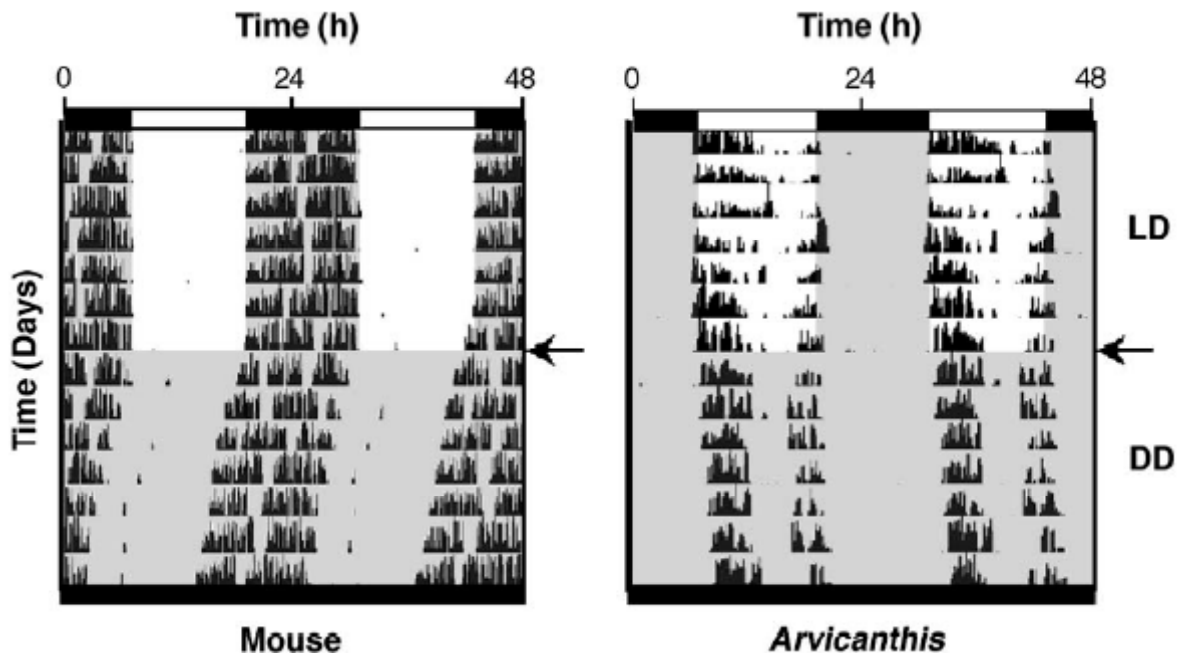


Figure 52: *Mus musculus* et *Arvicanthis ansorgei* présentent une activité locomotrice de roue clairement nocturne et diurne, respectivement.

Enregistrements représentatifs de l'activité locomotrice de roue en double représentation. Les animaux sont maintenus en conditions LD12:12 (barres horizontales blanches et noires en haut), avant d'être placés en obscurité constante (barre horizontale noire en bas) au moment indiqué par la flèche. Les zones grisées symbolisent l'obscurité. La souris *Mus musculus* présente un rythme journalier et circadien d'activité locomotrice nettement marqué. A l'inverse, l'activité locomotrice du rat *Arvicanthis ansorgei* est tout aussi rythmique mais s'effectue pendant le jour (subjectif). En libre cours, ces deux espèces montrent un rythme endogène inférieur (souris) et légèrement supérieur (*Arvicanthis ansorgei*) à 24h.

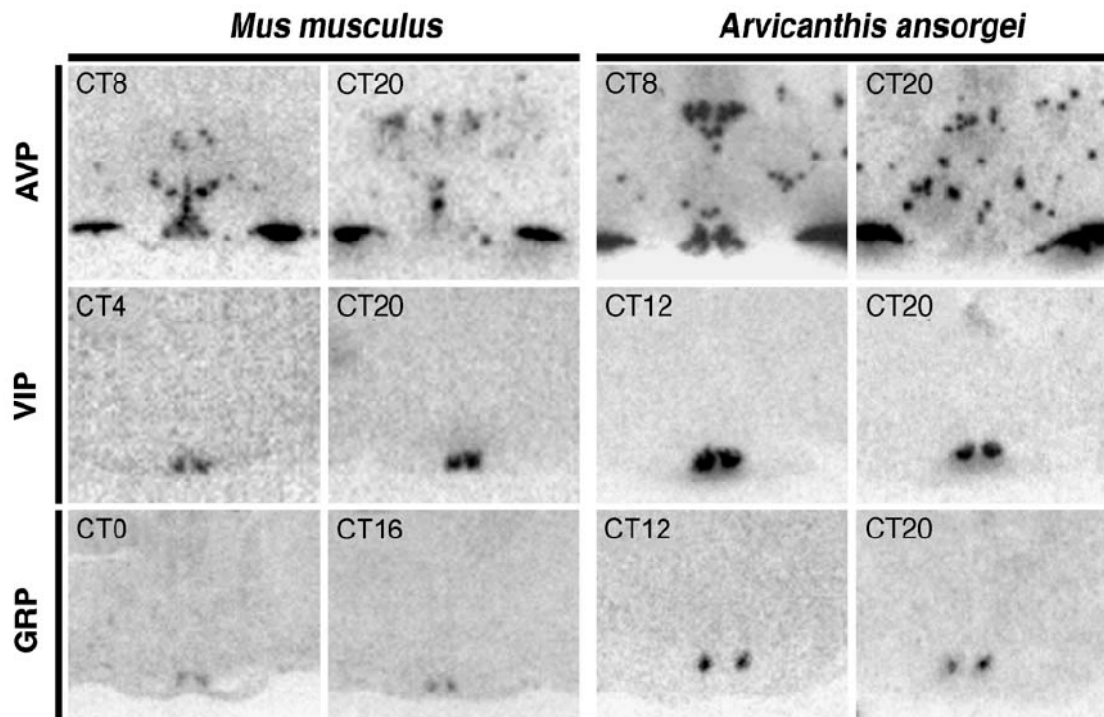


Figure 53 : Exemples représentatifs du marquage autoradiographique dans les SCN chez la souris *Mus musculus* et le rat *Arvicanthis ansorgei*.

Pour chacune des deux espèces et pour chaque neuropeptide étudié, une photo représentative à l'heure de l'acrophase (gauche) et de la bathyphase (droite) des pics d'ARNm, est donnée.

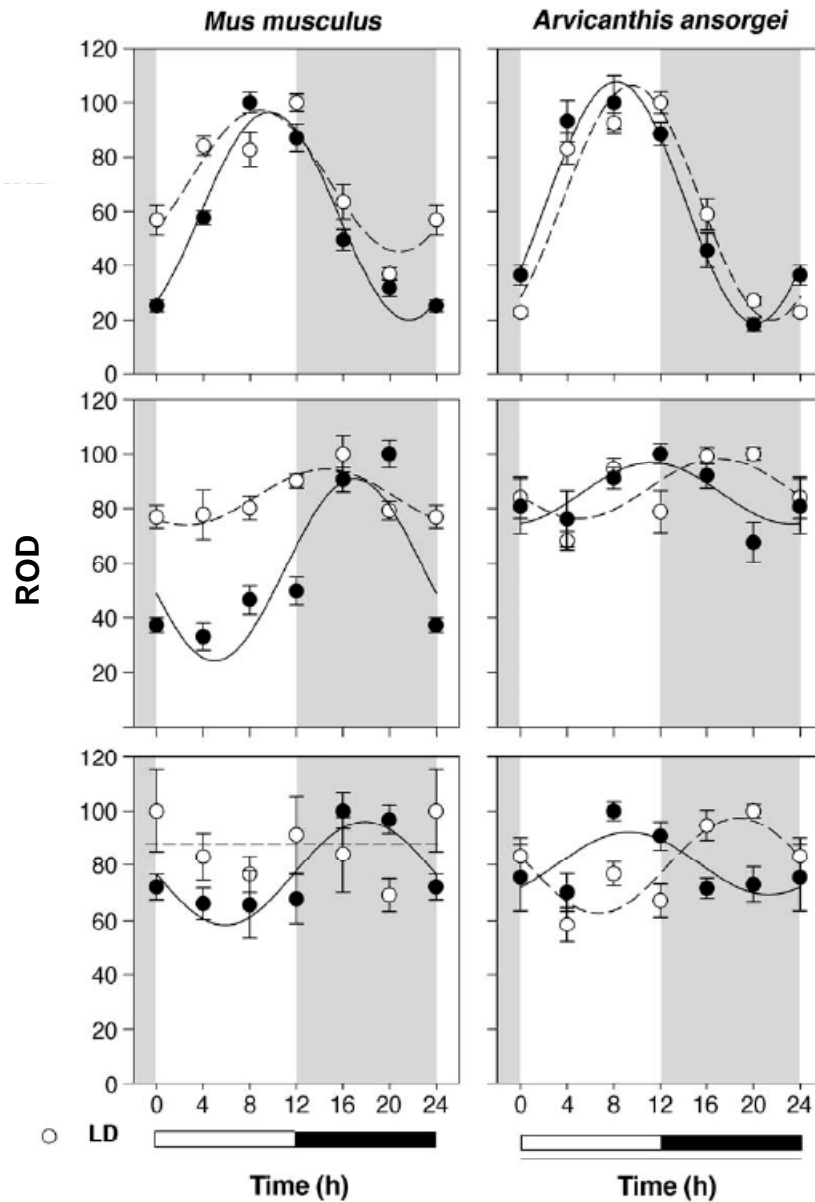


Figure 54 : Variations journalières et circadiennes de l'expression de l'Avp, du Vip et du Grp chez la souris *Mus musculus* et le rat *Arvicanthis ansorgei*.

Pour chaque peptide et chaque espèce, les résultats sont normalisés en pourcentage en fonction du maximum d'expression. L'étude a été effectuée dans deux conditions lumineuses : en cycle LD12:12 (ronds blancs) et en obscurité constante (ronds noirs). Les courbes représentent les régressions non linéaires des niveaux d'ARNm des gènes en LD (lignes discontinues) et en DD (lignes continues). Les barres verticales blanches et grises représentent les périodes de jour et de nuit (subjectif) d'un cycle LD et les temps correspondent aux temps circadiens (CT) et journaliers (ZT) avec ZT(CT)0 définissant le début du jour (subjectif). Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux. ROD : relative optical density.

◆ *Chez la souris*

L'expression de l'*Avp* est dépendante du temps dans les deux conditions d'éclairément ($F_{5,46}=72.6^{***}$). L'analyse du cosinor montre une acrophase située à ZT9.0±0.5h en LD et à CT9.6±0.2h en DD (test-t*).

Dans le cas du gène *Vip*, son expression dépend du temps dans les deux conditions ($F_{5,46}=23.4^{***}$). Une différence du moment de l'acrophase (test-t**) est mise en évidence avec un pic d'expression d'amplitude plus faible et plus tôt en condition LD (ZT14.5±1.1h) qu'en DD (CT17.6±0.5h).

L'expression du *Grp* est dépendante du temps ($F_{5,43}=2.7^*$) uniquement en condition DD et l'acrophase du pic se situe à CT18.1±0.9h. En condition LD, le temps n'a pas d'effet significatif sur les niveaux d'ARNm de ce gène ($p>0.05$).

◆ *Chez Arvicanthis ansorgei*

Le temps a un effet sur l'expression de l'*Avp* dans les deux conditions d'éclairément ($F_{5,46}=81.6^{***}$) et l'analyse du cosinor révèle une avance de phase en DD par rapport à LD (CT8.1±0.3h en DD vs ZT9.4±0.3h en LD, test-t**).

Le gène *Vip* a une expression dépendante du temps dans les deux conditions ($F_{5,46}=3.8^*$) avec une avance de phase d'environ 6 heures en DD par rapport à LD (CT11.3±1.1h en DD vs ZT17.1±1.3h en LD, test-t***).

La présence des ARNm du *Grp* dépend du temps dans les deux conditions ($F_{5,46}=4^{***}$) et un rythme présente une acrophase en DD 9 heures avant celle obtenue en LD (CT9.8±1.3h en DD vs ZT18.8±0.8h en LD, test-t***).

Ces résultats ont été publiés dans Molecular Brain Research en 2004.

3.2.2. Expressions journalière et circadienne du *Tgfa*.

Comme précédemment, les souris *Mus musculus* et les rats *Arvicanthis ansorgei* sont maintenus en conditions d'éclairément LD12:12 et, deux jours avant les prélèvements, la

moitié des animaux est transférée en DD. Dans une première expérience, quatre ou cinq animaux sont prélevés par condition, toutes les 4 heures, pendant un cycle de 24 heures. Les hybridations ont été effectuées pour *Tgfa* et pour *Per1*.

Au regard des résultats obtenus pour *Tgfa* dans cette première expérience, un second protocole a été mis en œuvre pour tester l'effet direct de la lumière sur l'expression du *Tgfa* dans les SCN chez *A. ansorgei*. Pour cela, au cours du deuxième jour en DD, la moitié des animaux est exposée à un créneau lumineux pendant 1 heure (à CT6) et l'autre moitié reste en DD. Les prélèvements ont été effectués 1 ou 2 heures après. Enfin, pour vérifier l'effet d'un créneau plus long de lumière, un nouveau groupe d'*A. ansorgei* a été exposé pendant 6 heures à la lumière (à partir de CT2) le deuxième jour après transfert des animaux en DD. Un groupe resté en DD et un autre en LD servent de contrôles. Les prélèvements ont été réalisés 6 heures après le début du créneau lumineux, soit à ZT/CT8. Un point supplémentaire a été ajouté pour la condition LD à ZT16 afin de confirmer le résultat obtenu dans la première expérience.

Pour la première expérience, un exemple représentatif de marquage obtenu par hybridation *in situ* chez ces deux espèces et à deux temps circadiens, est présenté [figure 55](#). Les données brutes de chaque expérience sont présentées comme valeur calculée \pm SEM sur les [figures 56 et 57](#). Les résultats de l'ANOVA à un (temps) et à deux facteurs (LD vs DD) sont indiqués et des régressions non linéaires ont été réalisées lorsqu'un effet du temps a été détecté dans le but de comparer le moment de l'acrophase du pic d'expression d'un gène chez une espèce, entre les deux conditions lumineuses.

◆ *Expression de Per1 et de Tgfa chez la souris (figure [figure 56](#), à gauche)*

L'expression de *Per1* est dépendante du temps en LD comme en DD ($p < 0.001$). Dans les deux cas, l'acrophase se situe en milieu de jour (ZT6.7 \pm 0.47 en LD and CT6.4 \pm 0.34 en DD), la condition d'éclairement est sans effet (ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$).

Le temps a également un effet sur l'expression du gène *Tgfa* dans les deux conditions ($p < 0.05$) pour lesquelles, le pic se situe à la transition nuit/jour (CT 0.23 \pm 2.4 en DD vs. ZT0.23 \pm 0.74 en LD, ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$).

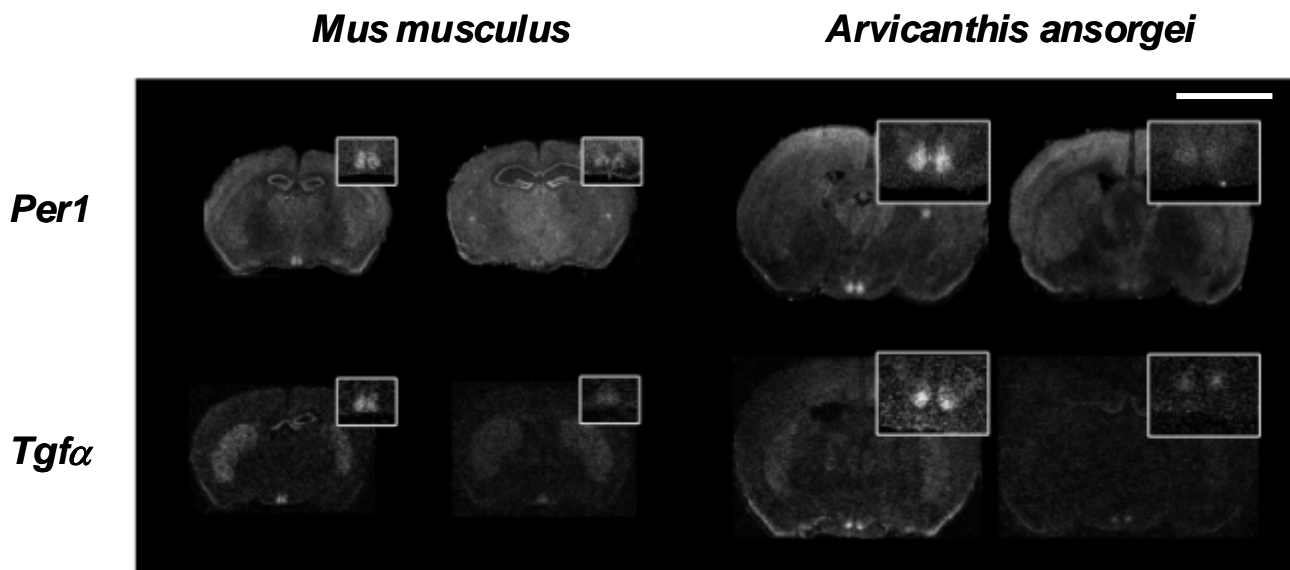


Figure 55 : Exemples représentatifs du maximum et du minimum d'expression de *Per1* et de *Tgfa* dans les SCN, de souris *Mus musculus* et de rats *Arvicanthis ansorgei*, maintenus en DD.

Les photos présentées ici sont en couleur inversée. Les coupes présentées pour *Per1* correspondent à CT4 et CT20, valeurs d'acrophase et de bathyphase du pic d'ARNm. Les points horaires choisis pour *Tgfa*, CT0 et CT8, correspondent également au maximum et au minimum d'expression. La barre horizontale blanche représente 5 mm. En encart, les SCN agrandis.

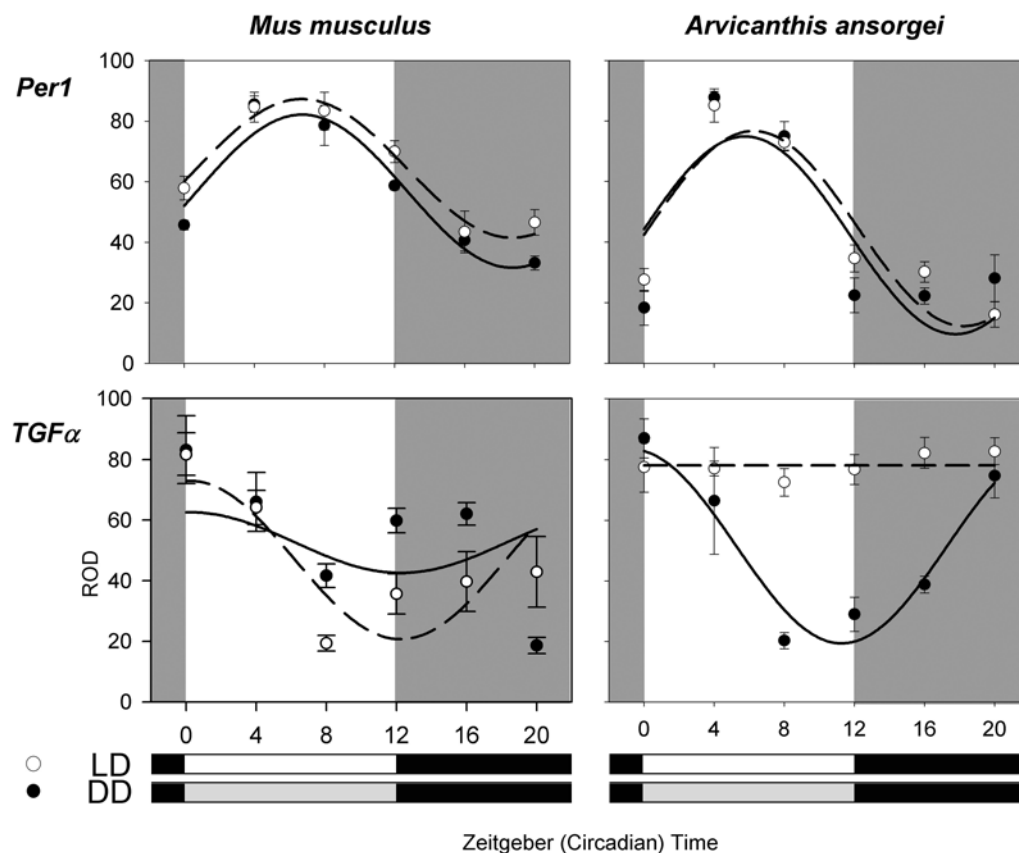


Figure 56 : Niveaux journaliers et circadiens d'ARNm de *Per1* et de *Tgfa* dans les SCN de la souris *Mus musculus* et du rat *Arvicanthis ansorgei*.

Les résultats sont normalisés en % par espèce et par gène en fonction de la valeur maximale quantifiée. L'étude a été effectuée dans deux conditions lumineuses : en cycle LD12:12 (ronds blancs) et en obscurité constante (ronds noirs). Les courbes représentent les régressions non linéaires des niveaux d'ARNm des gènes en LD (lignes discontinues) et en DD (lignes continues). Les barres verticales blanches et grises représentent les périodes de jour et de nuit (subjectif) d'un cycle LD et les temps correspondent aux temps circadiens (CT) et journaliers (ZT) avec ZT(CT)0 définissant le début du jour (subjectif). Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 souris ou de 5 *A. ansorgei*. ROD : relative optical density.

◆ *Expression de **Per1** et de **Tgfa** chez **A. ansorgei** ([figure 56](#), à droite)*

Les niveaux d'ARNm de **Per1** dépendent du temps, aussi bien journalier que circadien ($p < 0.001$). Dans les deux cas, les pics se situent en milieu de jour (ZT5.42 \pm 0.44 en LD et CT5.37 \pm 0.6 en DD; ANOVA à deux facteurs, $p > 0.05$).

Pour le gène **Tgfa**, la présence des ARNm en LD n'est pas dépendante du temps ($p > 0.05$). En conditions constantes DD, l'expression de **Tgfa** est dépendante du temps avec des valeurs maximales à la transition subjective nuit/jour (CT23.27 \pm 0.6) et minimales à la transition subjective jour/nuit. En DD, la moyenne des valeurs mesurées est de 51.41% \pm 3.47 (de l'expression maximale mesurée) et en LD, de 78.14% \pm 2.03. Cette différence est significative (ANOVA à un facteur, la condition d'éclairement, $p < 0.001$).

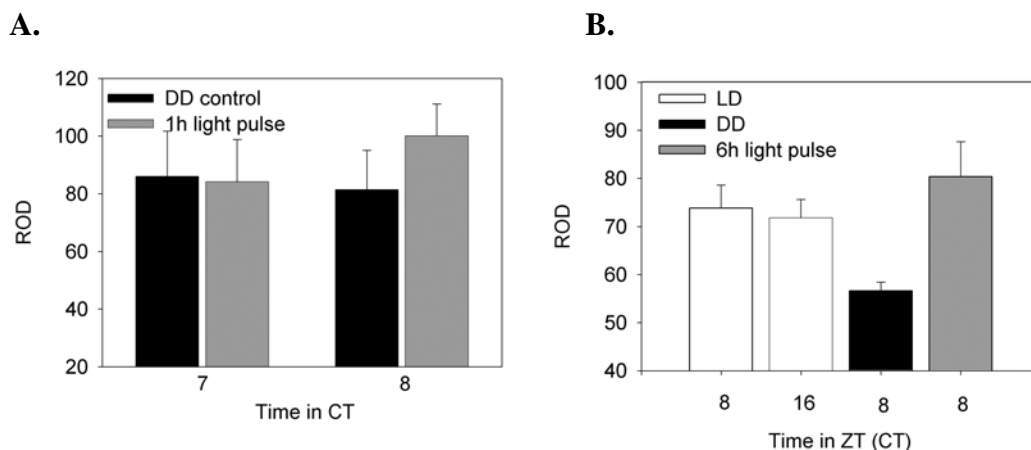
◆ *Effet d'un créneau de courte durée sur l'expression du **Tgfa***

Une exposition des animaux à la lumière pendant 1 heure à CT6 n'a aucun effet sur l'expression du **Tgfa**, 1 ou 2 heures après exposition, par rapport aux valeurs mesurées pour le groupe contrôle resté en DD ($p > 0.05$, [figure 57A](#)).

◆ *Effet d'un créneau de longue durée sur l'expression du **Tgfa***

Une partie des animaux est exposée à la lumière, pendant 6h, à partir de CT2. L'expression du **Tgfa** a été mesurée pour le groupe LD contrôle, le groupe DD contrôle et le groupe exposé à la lumière, les résultats sont présentés [figure 57B](#). Premièrement, les valeurs obtenues en LD à deux points horaires, ZT8 et ZT16, ne sont pas différentes (ANOVA à un facteur, $p > 0.05$). Deuxièmement, le traitement (LD vs. DD) produit une diminution de l'expression en DD (ANOVA à un facteur, la condition d'éclairement, $p < 0.05$). Troisièmement, une exposition des animaux à la lumière, pendant 6 heures, produit une augmentation de l'expression dont les valeurs sont significativement plus élevées que celles obtenues en DD (ANOVA à un facteur, la condition d'éclairement, $p < 0.05$). Enfin, les niveaux mesurés en LD (à ZT8 comme à ZT16) et après l'exposition à la lumière, ne sont pas différents (ANOVA à un facteur, la condition d'éclairement, $p > 0.05$).

Ces résultats sont en cours de rédaction pour publication (article en préparation n°3).



*Figure 57 : Un créneau de lumière de longue durée mais pas de courte durée, peut induire l'expression de $Tgfa$ dans les SCN de *Arvicantis ansorgei*.*

Les résultats sont normalisés par expérience en fonction de la valeur maximale mesurée. **A.** Les animaux sont placés en DD deux jours avant le créneau de lumière. Un créneau de lumière d'une heure est effectué à CT6 et les animaux sont sacrifiés 1h ou 2h après le début du créneau (barres grises). Les animaux des groupes contrôles (DD, barres noires) sont sacrifiés aux mêmes moments. **B.** Des animaux contrôles sont placés en LD et sacrifiés à ZT8 et ZT16 (barres blanches) ou sont placés en DD pendant 2 jours et sacrifiés à CT8 (barre noire). Un autre groupe d'animaux, sacrifié à CT8, a été placé pendant 6h à la lumière à partir de CT2 (barre grise). La seule différence significative obtenue est pour le groupe contrôle DD (vs tous les autres groupes). Ces groupes présentent des valeurs identiques (LD, ZT8 vs ZT16 ou vs DD, CT8 après 6h de lumière).

3.3. DISCUSSION.

Nous avons donc cherché à déterminer si l'expression de différents neuropeptides chez la souris et chez *A. ansorgei*, est de nature circadienne et si la présence de la lumière modifie leur expression. L'expression du gène *Avp* est nyctémérale et circadienne chez ces deux espèces et présente un maximum en fin de jour (subjectif), vers ZT(CT)9-10. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés pour la souris (Smith & Carter, 1996) et le rat (Yamase *et al.*, 1991 ; Cagampang *et al.*, 1994 ; Larsen *et al.*, 1994 ; Isobe & Nishino, 1998). Cette similitude d'expression entre ces deux espèces (nocture et diurne) est en accord avec les observations suivantes : (1) le contrôle positif de la transcription de l'*Avp* est dû aux dimères CLOCK/BMAL1 via les E-box présentes dans son promoteur (Jin *et al.*, 1999) et (2) l'expression des différents gènes horloges est similaire entre ces deux espèces (Caldelas *et al.*, 2003). Il semble donc très probable que la présence rythmique de l'AVP soit identique entre ces deux espèces. Etant donné que l'expression du *Vip* et du *Grp* n'est pas circadienne chez le rat (Takahashi *et al.*, 1989 ; Morin *et al.*, 1991 ; Shinohara *et al.*, 1993 ; Okamura & Ibata, 1994), nous avons voulu déterminer si ce constat pouvait se généraliser à d'autres espèces de rongeurs. Contrairement aux résultats obtenus chez le rat (voir [chapitre A.1.2.2.](#)), le *Vip* est exprimé de façon rythmique en DD chez la souris et *A. ansorgei*. Chez la souris, le maximum d'expression est obtenu pendant la nuit subjective (CT18) et cette expression est augmentée en LD. En revanche, chez *A. ansorgei*, les profils moyens d'expression du *Vip* sont très similaires entre les deux conditions d'éclairement. Cependant, la lumière semble retarder l'apparition du maximum d'expression (CT11 en DD vs ZT17 en LD). L'expression du *Vip* semble donc être spécifique à chacune des espèces, ce qui est également confirmé chez d'autres espèces. En effet, chez les hamsters syrien et sibérien, le maximum d'expression est obtenu de jour (nos résultats obtenus par la suite et Duncan *et al.*, 1995) et chez l'homme, l'immunoréactivité au VIP ne présente pas de variations diurnes (Hofman *et al.*, 1996). Concernant l'expression du *Grp*, elle apparaît être endogène chez la souris comme chez *A. ansorgei*, avec des maxima obtenus à CT18 et CT8, respectivement. En conditions LD, la présence des ARNm du *Grp* n'est plus rythmique chez la souris tandis que chez *A. ansorgei*, la rythmicité persiste mais avec un important retard de phase (pic à ZT18). Les résultats obtenus pour *Vip* et *Grp* sont assez semblables entre les deux conditions d'éclairement, chez la souris comme chez *A. ansorgei*. L'expression de ces peptides est circadienne et semble

fortement affectée par la présence de la lumière, en provoquant une augmentation des niveaux chez la souris et retardant l'expression chez *A. ansorgei*.

Indépendamment du caractère nocturne ou diurne des espèces, l'organisation de l'expression des neuropeptides est similaire en LD avec un pic d'expression de l'*Avp* en fin de jour et du *Vip* en milieu de nuit, seule l'expression du *Grp* diffère. En DD, ces décalages de phase entre ces peptides sont conservés chez la souris mais n'existent plus chez *A. ansorgei* qui présente alors un pic d'*Avp*, de *Vip* et de *Grp* en fin de jour. Globalement, l'expression des neuropeptides est peu différente entre ces deux espèces, la discrimination entre espèces nocturne et diurne ne semble donc pas avoir son origine dans l'expression ni des gènes horloges (Caldelas *et al.*, 2003) ni des neuropeptides dans les SCN.

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons caractérisé les profils d'expression circadien et journalier de *Tgfa* chez un rongeur nocturne et chez un diurne, afin de confirmer ou d'infirmer son implication dans le contrôle de l'activité locomotrice et de mettre en évidence si cette expression dépend des conditions lumineuses. Chez les deux espèces, l'expression de *Tgfa* est circadienne avec un pic d'expression pendant le jour subjectif chez la souris et pendant la nuit subjective chez *A. ansorgei*. En revanche, en LD, cette expression ne reste rythmique que chez la souris. Chez *A. ansorgei*, les taux d'ARNm restent toujours élevés en présence d'un cycle LD ce qui a été confirmé dans la troisième expérience (ZD8 vs ZD16). La lumière a donc un effet activateur de l'expression de *Tgfa* chez cette espèce. Dans le but de montrer si cet effet de la lumière est direct ou s'il résulte d'un effet tonique, nous avons appliqué aux animaux, pendant le jour subjectif, une exposition à la lumière, de courte ou de longue durée. Dans le premier cas, l'expression du *Tgfa* ne diffère pas de celle obtenue en DD avec la longue durée, les valeurs obtenues sont plus élevées que celles obtenues en DD et sont de type LD. Ainsi, l'expression de *Tgfa* est circadienne chez les deux espèces et la lumière présente un effet tonique activateur sur cette expression chez *A. ansorgei* uniquement. Pour avoir des contrôles pour cette étude, nous avons effectué sur des coupes sériées, des hybridations pour *Per1* et aussi avec une sonde identique à l'ARNm endogène de *Tgfa*, sonde sens. Chez la souris comme chez *A. ansorgei*, le pic de *Per1* se situe au même moment en LD et en DD, ce qui confirme les données de la littérature (souris : Albrecht *et al.*, 1997 ; Sun *et al.*, 1997 ; Tei *et al.*, 1997 ; Shearman *et al.*, 1997 ; *A. ansorgei* : Caldelas *et al.*, 2003). L'absence de marquage obtenu avec la sonde sens de *Tgfa*, confirme la spécificité du marquage obtenu avec la sonde de séquence complémentaire à l'ARNm endogène de *Tgfa*.

Le TGF α est supposé être un facteur inhibiteur de l'activité locomotrice (Kramer *et al.*, 2001 ; Snodgrass-Belt *et al.*, 2005). Les résultats que nous avons obtenus confirment cette hypothèse chez la souris qui présente une activité locomotrice pendant la nuit (subjective) et une expression rythmique du *Tgf α* avec des valeurs maximales à la transition nuit/jour et des valeurs minimales à la transition jour/nuit. Ainsi, l'acrophase du pic d'ARNm de *Tgf α* est en phase avec la période de repos et sa bathyphase en phase avec celle d'activité. En revanche, pour *A. ansorgei*, l'activité locomotrice (figure 52) et le pic d'expression de *Tgf α* (figure 56) sont pratiquement en phase, pendant le jour subjectif (le pic d'ARNm étant situé à CT23.27 \pm 0.6). De plus, en conditions LD, l'activité locomotrice est limitée à la partie lumineuse du cycle LD mais l'expression de *Tgf α* est constitutive avec des niveaux élevés tout au long du cycle LD (par rapport aux niveaux mesurés en DD). Ainsi, le profil d'expression de *Tgf α* ne semble pas être corrélé avec le rythme d'activité locomotrice de roue chez *A. ansorgei*. Même en considérant que TGF α pourrait être inhibiteur de l'activité locomotrice chez les rongeurs nocturnes et activateur chez les diurnes (hypothèse effectuée par Lambert *et coll.*, 2005, au sujet de la PK₂), cela ne suffirait pas à expliquer l'expression constitutive de *Tgf α* en LD chez *A. ansorgei*.

Pour provoquer un effet, le TGF α se fixe sur son récepteur de la famille des récepteurs ErbB, le EGFR (ou ErbB1) (Jones *et al.*, 1999). Or, ce n'est pas le seul facteur qui interviendrait dans le contrôle de l'activité locomotrice : l'EGF et la Neuregulin-1 β induisent les mêmes effets que le TGF α lorsqu'ils sont infusés dans le troisième ventricule (Snodgrass-Belt *et al.*, 2005). L'EGF peut se fixer à l'EGFR mais pas la Neuregulin-1 β qui utilise d'autres récepteurs de la famille ErbB, les ErbB3 et ErbB4 (Jones *et al.*, 1999 ; Yarden & Sliwkowski , 2001). Ainsi, les effets inhibiteurs rapportés par infusion ICV de TGF α ne seraient pas spécifiques de ce facteur ni de l'EGF mais spécifiques des récepteurs ErbB. De plus chez les souris *Tgf α ^{-/-}*, l'activité locomotrice basale (mesurée dans un open field) n'est pas augmentée par rapport aux souris sauvages (Burrows *et al.*, 2000) infirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle le TGF α inhibe cette activité. Comme les récepteurs ErbB interviennent dans de nombreux tissus et que les effets qu'ils provoquent sont spécifiques au tissu, nous ne pouvons pas confirmer le rôle qu'ils jouent dans ce mécanisme d'inhibition (Yarden & Sliwkowski , 2001). Cependant, chez les souris *waved-2* présentant une réduction de l'activité du récepteur EGFR de 80-95% (le mutants *Egfr^{-/-}* ne sont pas viables, Luetkeke *et al.*, 1994 ; Threadgill *et*

al., 1995), l'activité locomotrice en DD est identique à celle des souris sauvages (Kramer *et al.*, 2001) montrant ainsi que ces récepteurs ne semblent pas nécessaires.

Comme le récepteur EGFR est également présent au sein même des SCN (hamster Syrien : Jobst *et al.*, 2004 ; rat : Hao & Schaber, 2006 ; souris : van der Zee *et al.*, 2005), nous pouvons formuler une nouvelle hypothèse quant au rôle du TGF α : il est possible qu'il agisse directement dans les SCN et non comme un facteur diffusible en dehors de cette structure. En accord avec cette hypothèse, il a été décrit que l'immunoréactivité au TGF α ne présente pas de rythmicité au cours d'un cycle LD, chez les souris (van der Zee *et al.*, 2005). L'action du TGF α pourrait concerner la synchronisation des neurones des SCN et plusieurs arguments sont en faveur de cette supposition. Le fait que le TGF α soit fortement exprimé par les astrocytes (plus que dans les neurones) conforte cette idée sachant que les prolongements astrocytaires présentent une variation circadienne (Lavialle & Serviere, 1993 ; Harley *et al.*, 2001). Aussi, une interaction dépendante du temps avec les neurones est possible via le TGF α . De plus, la régionalisation des neurones des SCN exprimant différents peptides joue un rôle important dans la synchronisation, la génération et la distribution des signaux efférents (Shinohara *et al.*, 1995 ; Maywood *et al.*, 2006). Comme les neurones à TGF α ne colocalisent pas avec ceux à AVP (van der Zee *et al.*, 2005), cela confirme encore l'hypothèse selon laquelle le TGF α joue un rôle dans la synchronisation des neurones.

Comme l'implication du TGF α dans le contrôle de l'activité locomotrice n'est pas confirmée d'un point de vue circadien/journalier, il ne semble pas imminent d'étudier les variations saisonnières de son expression tant que le rôle réel du TGF α dans les rythmes circadiens n'est pas mieux caractérisé.

4. Mécanisme de décodage du signal mélatoninergique par la *Pars tuberalis*.

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que l'horloge circadienne localisée dans les SCN est aussi responsable de l'intégration et de la construction du message photopériodique. Ainsi, les SCN contrôlent le rythme saisonnier de synthèse nocturne de mélatonine par la glande pinéale. L'une des cibles de la mélatonine est la PT de l'adénohypophyse intervenant dans la régulation annuelle de la qualité du pelage. L'expression des récepteurs de la mélatonine dans cette structure est d'ailleurs très conservée entre espèces (Masson-Pévet *et al.*, 1994b ; Morgan & Mercer, 1994). La PT exprime les produits des gènes horloges et cette expression semble régulée par la mélatonine (voir [chapitre A.2.4.3.](#)). Ainsi, au delà de sa fonction physiologique actuellement connue, la PT est le principal modèle d'étude du mode d'action moléculaire de la mélatonine et, indirectement, des mécanismes d'entraînement d'une structure périphérique par les SCN. Dans la PT, la mélatonine exogène permet d'augmenter les niveaux d'ARNm de *Cry1* et de diminuer ceux de *Per1* (Messenger *et al.*, 1999 ; Dardente *et al.*, 2003a).

Nous avons donc cherché à caractériser l'effet de la mélatonine sur la PT. D'une part en déterminant les variations photopériodiques des gènes horloges et d'autre part en étudiant l'effet direct de la mélatonine sur leur expression dans la PT.

4.1. CHEZ LE HAMSTER D'EUROPE.

4.1.1. Introduction.

Les hamsters syrien et sibérien présentent une augmentation de la durée du pic de mélatonine en SP et une diminution de l'amplitude des rythmes de *Per1* dans la PT. Chez le mouton, la durée de pic de mélatonine ne semble pas affecter l'amplitude des pics d'ARNm de *Per1*, de *Cry1* et de *Rev-erba* mais semble changer les phases des pics, ce qui est à la base du modèle de coïncidence interne décrit par Lincoln et coll (2002). Comme la variation annuelle du pic nocturne de mélatonine est très importante en durée et en amplitude chez le hamster d'Europe, nous avons donc choisi cette espèce pour étudier l'effet de cette variation (donc de la photopériode) sur la PT. Nous avons étudié les variations du pic de mélatonine par RIA et le

décours temporel sur 24h de présence des ARNm de gènes horloges paraissant être régulés positivement (*Cry1*) ou négativement (*Per1* et *Rev-erba*) par la mélatonine. Les animaux de cette étude sont les mêmes que ceux utilisés pour caractériser l'effet de la photopériode sur l'expression des gènes horloges dans les SCN ([chapitre D.1.2.](#))

4.1.2. Résultats.

Les animaux utilisés sont en conditions photopériodiques naturelles, donc les données sont présentées en fonction du ExtT12. Par cette représentation, l'arrivée du jour se situe à ExtT4 en LP et à ExtT8 en SP. Les différences entre photopériodes (SP comparée à LP) sont présentées comme valeur calculée \pm SEM. Les résultats de l'ANOVA à un et à deux facteurs (*F* test) sont vérifiés comme suit : ***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$.

◆ *Variations photopériodiques du pic de mélatonine*

Le pic de **mélatonine** présente des variations journalière et saisonnière ([figure 58, en haut](#)). L'amplitude du pic varie significativement de 63 ± 10 pg/glande en Juin contre 300 ± 41 pg/glande en Novembre (***). La durée du pic est aussi augmentée en SP par rapport à LP ($4.46h \pm 1.30^{**}$).

◆ *Expression photopériodique des gènes horloges dans la PT*

Les trois gènes horloges étudiés présentent des variations rythmiques de leur expression ([figure 58, en bas](#)). Le pic d'ARNm de *Cry1* se situe à la transition nuit/jour en LP (ExtT3-6) et au cours de la nuit en SP (ExtT15-1). Une augmentation de la durée du pic ($7.08h \pm 1.66^{***}$) est également observée en SP.

L'expression de *Per1* est transitoire et maximale 2h après l'arrivée de la lumière, quelque soit la photopériode (ExtT6 en LP et ExtT10 en SP) et sans effet significatif sur la phase du pic.

Concernant les niveaux d'ARNm de *Rev-erba*, un pic est présent 5h (ExtT9 en LP) ou 8h (ExtT16 en SP) après l'arrivée du jour et cette différence de phase n'est pas significative ($p>0.05$).

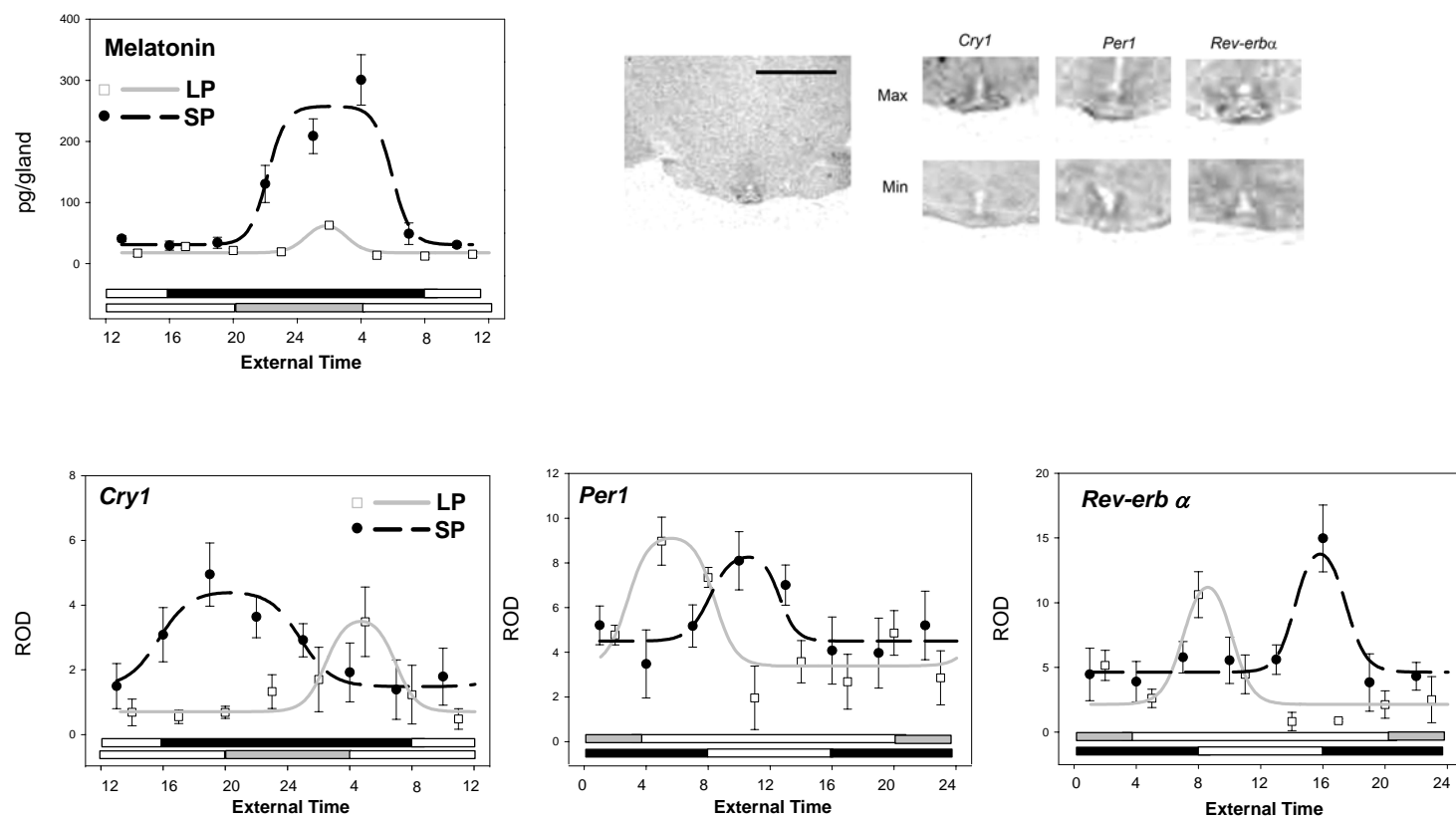


Figure 58 : Variations journalières des quantités de mélatonine pinéaliene et des ARNm des gènes horloges dans la PT de hamster d'Europe dans deux conditions photopériodiques naturelles.

Variations journalières de la quantité pinéaliene de mélatonine déterminées par radio-immuno assay et des quantités d'ARNm des gènes horloges déterminés par hybridation *in situ* radioactive en LP naturelle (LP16:8, carré) et SP naturelle (SP8:16, cercles). Un exemple de marquage en LP sur une coupe entière est donné (la barre noire représente 5 mm) avec, en plus, un agrandissement de la zone contenant la PT pour chaque gène à deux temps journaliers correspondants aux maximum (max) et au minimum (min) de marquage. Sur les graphiques, les barres horizontales pleines et vides représentent les périodes d'obscurité et de lumière du cycle L/D respectivement. Les courbes représentent les régressions non linéaires des niveaux de mélatonine et des niveaux d'ARNm des gènes en LP (lignes continues et grises) et en SP (lignes discontinues et noires). Chaque points représente la moyenne \pm SEM de 4 à 6 animaux. ROD : relative optical density.

◆ *Effet d'une injection unique de mélatonine sur l'expression de Cry1*

Une injection unique de mélatonine réalisée en début de nuit (ExtT21) chez des animaux maintenus en photopériode longue naturelle a permis l'obtention de niveaux plasmatiques de mélatonine plus élevés que ceux obtenus pour le groupe salin, 2h et 4h post-injection ([figure 59](#), ANOVA à deux facteurs, interaction temps*photopériode, $F_{1,14}=5.66^*$).

Pour le groupe injecté-salin, les niveaux de *Cry1* sont plus élevés 4h que 2h après injection ([figure 59](#), ANOVA, $F_{1,14}=7.69^*$). Pour le groupe injecté-mélatonine, ces niveaux sont élevés 2h après injection mais 4h après injection ils sont diminués jusqu'à des niveaux équivalents au groupe "2h après injection-saline" (ANOVA à deux facteurs, interaction photopériode x temps, $F_{1,14}=62.48^*$).

Cette étude fait l'objet de la seconde partie de l'article en préparation n°1.

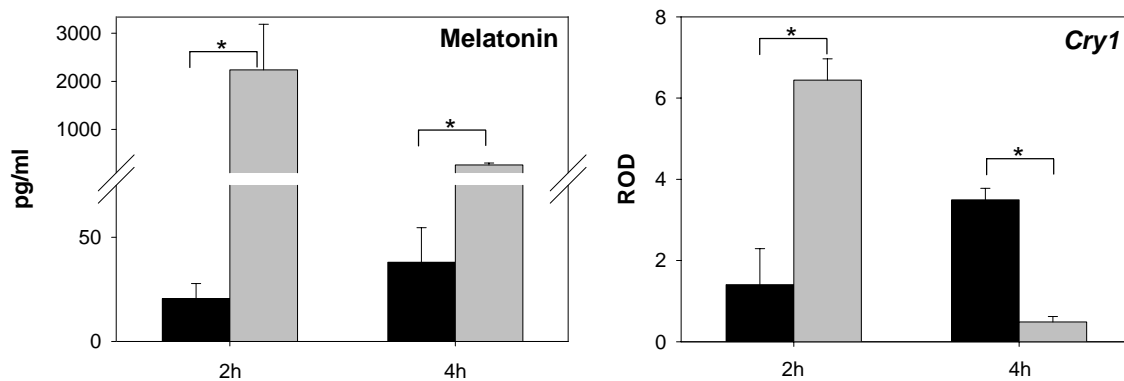


Figure 59 : Effet d'une injection unique de mélatonine sur l'expression de *Cry1* dans la PT de hamster d'Europe en LP naturelle.

L'injection saline ou de mélatonine a été effectuée une heure après le début de la nuit et les sacrifices 2 ou 4 heures après injection. Les barres noires représentent le groupe salin et les grises le groupe mélatonine. Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux. Gauche : niveaux plasmatiques de mélatonine, en pg/ml, déterminés par dosage radioimmunologique. Droite : niveaux d'ARNm de *Cry1* dans la PT, en ROD (relative optical density), déterminés par hybridation *in situ* radioactive. Les étoiles indiquent une différence significative ($P < 0.05$).

4.1.3. Discussion.

Le fonctionnement de la PT est dirigé par la mélatonine (Messenger *et al.*, 1999 ; Lincoln *et al.*, 2002 ; Dardente *et al.*, 2003a ; Hazlerigg *et al.*, 2004). En effet, l'expression de *Cry1* dans la PT est rythmique et les quantités d'ARNm augmentent en phase avec l'augmentation plasmatique de mélatonine chez le rat et le mouton (Dardente *et al.*, 2003a ; Hazlerigg *et al.*, 2004). A l'inverse, les niveaux d'ARNm de *Per1* dans la PT augmentent avec la diminution sérique de mélatonine chez le mouton (Hazlerigg *et al.*, 2004) et le hamster sibérien (Messenger *et al.*, 1999). Ces effets opposés de la mélatonine ont permis de définir un modèle du décodage de signal mélatoninergique par la PT, le modèle de coïncidence interne (paragraphe A.2.4.3.3. et Lincoln *et al.*, 2002). Cependant, plusieurs points restent peu compris. Premièrement, l'expression de *Per1*, inhibée par une injection de mélatonine, paraît tout de même être régulée positivement *in vivo* par la mélatonine car les animaux pinéalectomisés ou les souris KO pour le récepteur MT1, ne présentent pas d'ARNm détectables de *Per1*. Deuxièmement, ce modèle ne semble pas applicable à toutes les espèces puisque l'expression de *Per1* est inhibée en SP chez les hamsters syrien et sibérien (Messenger *et al.*, 1999, 2000). De manière surprenante, la régulation des gènes horloges dans la PT du hamster d'Europe paraît être plus proche de celle du mouton que de celle des autres rongeurs étudiés : (1) *Per1* est rythmique en LP et en SP, (2) les pics d'ARNm de *Per1* et de *Rev-erba* restent corrélés avec l'arrivée du jour dans les deux photopériodes. Le profil d'expression obtenu pour *Rev-erba* est d'ailleurs très proche de celui décrit chez le mouton (Hazlerigg *et al.*, 2004). Enfin, le pic d'expression de *Cry1* est en avance de phase et présente une augmentation de durée en SP par rapport à LP ce qui est en accord avec le modèle de coïncidence interne. Cependant, contrairement à la situation LP, il ne semble pas y avoir de relation claire entre le pic de mélatonine et celui de *Cry1* en SP. Comme les récepteurs de la mélatonine présentent des variations saisonnières en quantités et en qualités (état de sensibilisation/désensibilisation) il est possible que ces facteurs jouent un rôle pour l'établissement du rythme d'expression de *Cry1*. De plus, la présence d'une horloge circannuelle chez le hamster d'Europe pourrait avoir une action sur l'expression de *Cry1* et ainsi compliquer l'interprétation de nos résultats. Par exemple, la pinéalectomie (Masson-Pévet *et al.*, 1994a) ou le maintien en conditions photopériodiques constantes (Canguilhem *et al.*, 1988a) n'inhibent pas totalement le rythme saisonnier de reproduction chez cette espèce.

Aussi, l'expression de *Cry1* en SP pourrait également être expliquée par l'existence de cette horloge endogène circannuelle.

Nous avons effectué une injection saline ou de mélatonine en début de nuit chez des animaux maintenus en LP. Le groupe salin présente des quantités d'ARNm de *Cry1* plus élevées 4h après injection que 2h après. Cette augmentation correspond au début de l'augmentation du pic de *Cry1* en conditions normales de LP (voir [figure 58](#)). Pour le groupe injecté à la mélatonine, l'expression de *Cry1* est rapidement induite (2h après injection), mais cette activation transitoire n'est pas suivie du pic d'expression endogène (4h après injection). Cette étude montre qu'en dépit des niveaux annuels les plus bas de mélatonine sérique, la sensibilité de la PT n'est pas pour autant réduite.

4.2. CHEZ LE MOUTON.

4.2.1. Introduction.

Chez le hamster d'Europe comme chez le rat ou encore chez le mouton, nous avons vu que la PT est sensible à une injection de mélatonine en terme d'augmentation de l'expression de *Cry1* et de diminution de celle de *Per1*. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la mélatonine dirige le fonctionnement de la PT. Plusieurs questions alors en découlent, (1) la présence d'un signal rythmique de mélatonine est-elle nécessaire pour obtenir les variations circadiennes des messagers horloges ? et (2) les effets de la mélatonine sont-ils restreints à des fenêtres d'activations/inhibitions situées aux transitions jour/nuit et nuit/jour ? Nous avons utilisé le mouton de Soay comme modèle, car il est l'objet de nombreuses études sur les réponses moléculaires de la PT aux variations de mélatonine. Pour répondre à la première question, un premier groupe d'animaux a été placé le jour des prélèvements en conditions de lumière constante afin d'inhiber le pic de mélatonine endogène. Pour répondre à la seconde question, un second groupe d'animaux, placé lui aussi en conditions de lumière constante a été utilisé. Toutes les 4h sur un cycle de 24h de lumière continue, des animaux ont reçu un implant de mélatonine et les prélèvements ont été effectués 3h après implantation. La vérification de la qualité des implants de mélatonine et de l'exposition des animaux à la lumière constante est réalisée par dosage des quantités plasmatiques en mélatonine et en prolactine.

Ces animaux sont les mêmes que ceux utilisés pour l'étude de l'effet de la mélatonine sur l'expression des gènes horloges dans les SCN ([chapitre D.2.2.](#)).

4.2.2. Résultats.

Les résultats sont présentés relativement au ZT0 définissant l'arrivée de la lumière constante. A ZT16, la lumière reste allumée jusqu'en fin d'expérience.

◆ *Effets du traitement sur les profils endocrines*

La lumière constante provoque une suppression de la concentration plasmatique en mélatonine tout au long des 24h ([figure 60A](#) ; concentration en mélatonine du groupe témoin : 10.4 ± 0.9 pg/ml, n=24). Les implants de mélatonine augmentent de manière significative la concentration en mélatonine dans les 3h après leur pose ([figure 60A](#) ; $p < 0.001$, effet du traitement, ANOVA) et cet effet est indépendant de l'heure de traitement ($p > 0.05$, ANOVA à deux facteurs, interaction temps*traitement). Les concentrations plasmatiques résultantes (216.9 ± 28.0 pg/ml, n=24) sont du même ordre que les taux nocturnes physiologiques obtenus chez cette espèce (Lincoln *et al.*, 2002).

Bien que la concentration en prolactine paraisse plus basse chez les animaux témoins (LL+ implant ne contenant pas de mélatonine) à ZT16 ([figure 60B](#)), il n'y a pas de différences significatives sur 24h dans chacun des deux groupes ($p > 0.05$, ANOVA un facteur). L'administration de mélatonine en lumière constante réduit la valeur plasmatique moyenne de prolactine ([figure 60B](#); concentration plasmatique en prolactine : 29.8 ± 4.0 vs 19.6 ± 2.6 ng/ml, groupe salin vs traité, n=24, $p < 0.01$, ANOVA à deux facteurs, effet du traitement). Et, cette réponse à la mélatonine n'est pas dépendante du temps ($p > 0.05$, ANOVA à deux facteurs, interaction temps*traitement).

◆ *Expression des gènes horloges dans la PT*

En dépit de l'absence de mélatonine dans la plasma chez le groupe témoin, l'expression de quatre des cinq gènes horloges analysés dans la PT présente une variation significative sur 24h ($p < 0.05$, ANOVA, [figure 61A](#)). Pour *Rev-erba* et *Per1*, qui présentent normalement des pics d'expression situés en début de jour chez les animaux placés en LP (Lincoln *et al.*, 2002 ; Hazlerigg *et al.*, 2004), un pic indépendant de la mélatonine est observé environ 20 heures après le début de la lumière constante. En revanche, leurs pics d'expression sont inhibés par une injection de mélatonine ($p < 0.05$, ANOVA à deux facteurs).

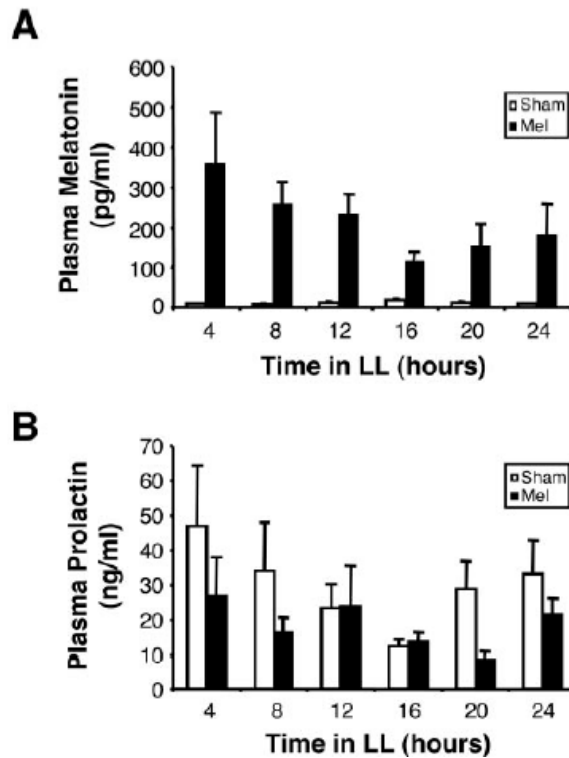


Figure 60 : Les implants de mélatonine induisent des niveaux plasmatiques physiologiques de mélatonine et inhibent la prolactine plasmatique en condition LL chez le mouton.

Niveaux journaliers de mélatonine (A) et de prolactine (B) sanguins déterminés par dosage radio-immunologique. Les animaux, élevés en LP, sont placés en LL le jour de l'expérience (la lumière reste allumée à la transition jour/nuit habituelle). Toutes les 4 heures, des animaux reçoivent un implant unique de mélatonine (ou de son solvant) et sont sacrifiés 3 heures après l'implantation. Les barres blanches représentent le groupe injecté-salin et les barres noires, le groupe injecté-mélatonine. Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux.

Pour *Per2*, dont le pic se situe après celui de *Per1* en LP (Lincoln *et al.*, 2002), une augmentation de son expression indépendante de la mélatonine, est observée après 24h d'exposition au LL. Ce pic d'ARNm est supprimé par l'injection de mélatonine ($p < 0.05$, ANOVA à deux facteurs).

De la même façon qu'en conditions LP (Lincoln *et al.*, 2002), un pic d'expression de *Bmal1* est observé entre ZT12 et ZT16 en LL pour le groupe salin et disparaît pour le groupe mélatonine ($p < 0.05$, ANOVA à deux facteurs).

A l'inverse des autres gènes, l'expression de *Cry1* chez les animaux placés en LL ne varie pas en fonction du temps ($p > 0.05$, ANOVA à un facteur) et présente des valeurs faibles à tous les points ([figure 61A et B](#)). Une infusion de mélatonine pour une période de 3heures provoque une large augmentation de l'expression de *Cry1* ($p < 0.001$ pour l'effet du traitement, ANOVA). Cette augmentation est observée à tous les points de prélèvements du cycle de 24h ($p > 0.05$, ANOVA à deux facteurs).

Ce travail représente la seconde partie de la publication dans [Endocrinology en 2006](#).

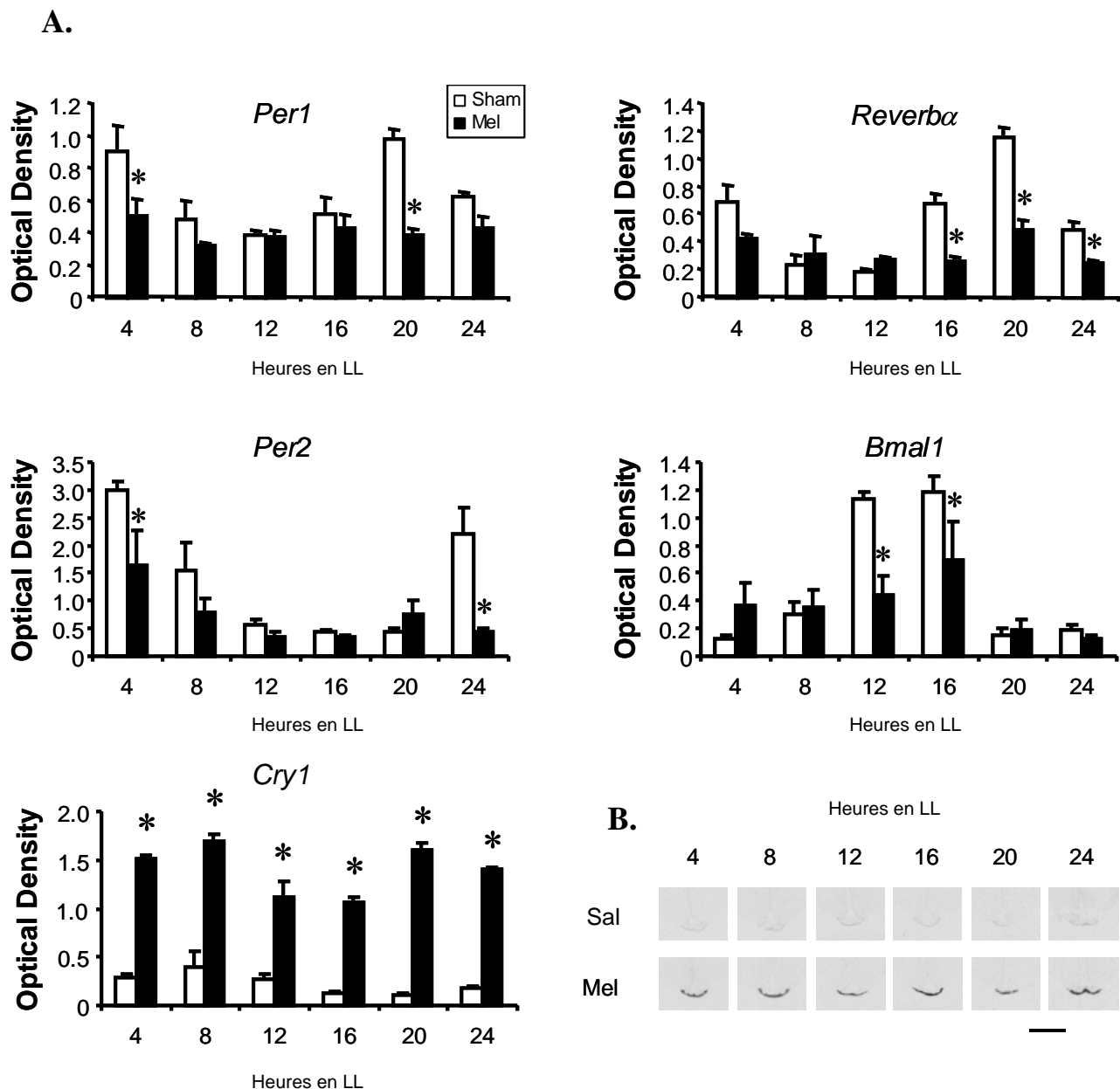


Figure 61 : Effet de la mélatonine exogène sur l'expression des gènes horloges dans la PT du mouton Soay.

A. Niveaux journaliers en LL d'ARNm des gènes horloges déterminés par hybridation *in situ* radioactive et exprimés en densité optique. Les animaux, élevés en LP, sont placés en LL le jour de l'expérience (la lumière reste allumée à la transition jour/nuit habituelle). Toutes les 4 heures, des animaux reçoivent un implant unique de mélatonine (ou de son solvant) et sont sacrifiés 3 heures après l'implantation. Les barres blanches représentent le groupe injecté-salin et les barres noires, le groupe injecté-mélatonine. Chaque point représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux. * : $p < 0.05$, ANOVA à deux facteurs. **B.** Exemples de marquage obtenu pour Cry1 en fonction du temps et de l'injection (sal : salin, Mel : mélatonine). La barre noire représente 5mm.

4.2.3. Discussion.

Des études récentes ont mis en évidence la présence rythmique des messagers des gènes horloges dans la PT chez les mammifères, et ont proposé des modèles par lesquels ces gènes pourraient médier les effets photopériodiques de la mélatonine (Lincoln *et al.*, 2003a, c). Dans cette étude, nous avons utilisé le mouton Soay pour démontrer que les rythmes des gènes horloges persistent en l'absence de sécrétion endogène de mélatonine. De plus, chez cette espèce, des infusions de mélatonine altèrent l'expression des gènes à toutes les phases du cycle de 24h dans la PT, sans aucun effet direct sur les SCN (chapitre D.2.2.). En résumé de ces effets, l'expression des gènes horloges dans la PT 3h après injection de mélatonine est modifiée : les messagers de *Cry1* sont élevés, sans effet du temps de l'infusion, alors que tous les autres ont une diminution des messagers au moment du pic endogène, donc en fonction de l'heure d'injection ([figure 61](#)). **Plus généralement, cette étude est le premier exemple d'effets multiples sur l'expression des gènes horloges à un unique stimulus endocrine.**

La PT présente une population homogène de cellules exprimant le récepteur de la mélatonine de type 1 (MT1) ce qui en fait un tissu idéal pour l'étude de l'action de la mélatonine (Klosen *et al.*, 2002 ; Dardente *et al.*, 2003b). Une abolition de l'expression rythmique des gènes horloges dans la PT par une inhibition à long terme de la sécrétion de mélatonine ou la perte de récepteurs MT1 fonctionnels, semble indiquer que le fonctionnement moléculaire de ce tissu est sous dépendance de la mélatonine (Sun *et al.*, 1997 ; Messenger *et al.*, 2001 ; von Gall *et al.*, 2002, 2005). Cependant, **nos résultats démontrent des variations temporelles significatives de l'expression de 4 gènes horloges sur une période de 24h en l'absence de mélatonine, ce qui supporte l'hypothèse de l'existence d'une horloge endogène dans la PT.** Ainsi, l'arythmie de l'expression de *Per1* dans la PT de hamsters pinéalectomisés 7 jours auparavant (Messenger *et al.*, 2001) pourrait dériver d'un amortissement progressif de cet oscillateur circadien. Sur la base des études récentes de découplage dans des systèmes de cellules en culture (Nagoshi *et al.*, 2004 ; Welsh *et al.*, 2004 ; Carr & Whitmore, 2005) nous pouvons penser que cet amortissement serait dû à la désynchronisation des oscillateurs individuels des cellules de la PT. En accord avec cette hypothèse, chez les souris déficientes en synthèse de mélatonine ou chez les souris déficientes en récepteur MT1 (Sun *et al.*, 1997 ; von Gall *et al.*, 2002, 2005), l'expression des gènes horloges dans la PT est arythmique car les

cellules de la PT n'ont jamais été synchronisées au cours du développement fœtal ou postnatal.

Cette étude a examiné seulement l'un des aspects de l'information inhérente au signal mélatoninergique endogène : des niveaux élevés de mélatonine associés à la phase nocturne. Nos résultats suggèrent une réponse de type transition jour/nuit (expressions de *Cry1* élevée et de *Pers*, *Rev-erba* et de *Bmal1* faibles) qui serait provoquée par des niveaux de mélatonine augmentant à chaque phase du cycle de 24h. Ceci suggère que le fonctionnement des cellules de la PT est dépendant des augmentations de mélatonine (Roenneberg *et al.*, 2003), ce qui veut dire que les mécanismes moléculaires inhérents à la PT seraient remis à l'heure en un état de transition jour/nuit ("état crépuscule") et indépendamment de l'état juste précédent. Cet état jour/nuit est transitoire car des résultats précédemment obtenus par G. Lincoln et D. Hazlerigg (2002), co-auteurs, ont montré des valeurs faibles de *Cry1* et élevées de *Bmal1*, en présence continue de mélatonine, du milieu à la fin de nuit. Comme les effets de la mélatonine sur la transduction des signaux cAMP-dépendants et sur l'expression des gènes horloges persistent durant une exposition prolongée de mélatonine (Hazlerigg *et al.*, 2001), il est probable que des mécanismes indépendants de la voie cAMP interviennent pour la disparition de l'"état crépuscule" dans des conditions physiologiques.

En parallèle, la PT de la caille japonaise présente également une expression rythmique des gènes horloges avec, cependant, une activation de la transcription de *Cry1* par la lumière. De plus, cette activation est restreinte à certains temps du cycle (Yasuo *et al.*, 2004) ce qui suggère que la PT des oiseaux contiendrait un oscillateur circadien plus robuste que celui des mammifères. Chez le mouton, en conditions naturelles, les heures d'apparition de l'aube et du crépuscule varient en direction opposée au cours de l'année, ce qui peut donner lieu à une certaine flexibilité de la réponse de la PT à la diminution de mélatonine à l'aube. Même si notre expérience ne le démontre pas directement, nos résultats sont en accord avec cette prédiction : le moment où survient l'aube, caractérisé par une augmentation des messagers de *Per1*, peut être décalé dans le temps par la présence de lumière la nuit précédente, ce qui serait en accord avec la diminution de mélatonine alors induite (Hazlerigg *et al.*, 2004). De ce fait, la PT du mouton montre une remarquable plasticité pour sa réponse aux changements de profils de sécrétion de mélatonine.

Des études concernant la PT des mammifères ont eu pour objectif de caractériser la modulation de l'activité de l'adénylate cyclase par la mélatonine (Hazlerigg *et al.*, 2001). La régulation par la mélatonine de *Per1*, considéré comme un gène de réponse précoce régulé par l'AMPc, utiliserait cette voie (Morgan *et al.*, 1998). Cependant, les autres gènes ne sont pas régulés par la voie AMPc, ce qui suggère que d'autres voies, non encore définies, interviennent dans cette régulation. En accord avec cette possibilité, des études effectuées sur différents tissus (incluant la PT du mouton) ont montré que d'autres voies étaient sensibles à la mélatonine (Vanecek, 1998). On ne peut cependant pas exclure la possibilité que l'induction de *Cry1* modifierait l'expression des autres gènes. Cependant, ce mécanisme supposerait une transcription et une traduction rapide de *Cry1* mais également une augmentation de l'instabilité des ARNm des autres gènes horloges pour avoir un effet après le temps relativement court (3heures) entre l'infusion de mélatonine et les prélèvements effectués dans cette expérience.

Au cours de cette expérience, nous avons vu également que lors des dernières 24h, l'injection de mélatonine en LL inhibait la sécrétion de prolactine. Ceci ne reflète certainement pas un effet direct sur les cellules lactotrophes qui, d'une part, sont dépourvues de récepteurs de la mélatonine (Williams *et al.*, 1997 ; Klosen *et al.*, 2002) et d'autre part, sont insensibles à la mélatonine *in vitro* (Stirland *et al.*, 2001). Il n'est pas clair si la mélatonine agit au niveau de la PT ou de l'hypothalamus pour supprimer la libération de prolactine. Comme les monoamines hypothalamiques ne contrôlent pas les changements photopériodiques de sécrétion de prolactine (Lincoln & Clarke, 1995, 2002), il est possible que la mélatonine stimule la sécrétion de dopamine, facteur inhibant la prolactine, par les neurones hypothalamiques (Shieh *et al.*, 1997 ; Chu *et al.*, 2000). Ou alors, la mélatonine pourrait inhiber la sécrétion par la PT de facteur(s) relargant(s) la prolactine ou tubéraline(s) (Hazlerigg *et al.*, 1996 ; Morgan *et al.*, 1996 ; Lafarque *et al.*, 1998 ; Stirland *et al.*, 2001 ; Johnston *et al.*, 2003). Cependant, le mécanisme par lequel la mélatonine agirait sur la tubéraline reste inconnu.

En résumé de cette étude, nous avons montré qu'un même signal hormonal peut avoir des effets opposés sur la transcription des gènes horloges. Ainsi, la PT pourrait devenir un tissu modèle, pour l'étude du fonctionnement des oscillateurs périphériques circadiens comme pour l'étude de la mesure du temps photopériodique, sachant que sa principale voie d'entrée, la mélatonine, est bien connue.

E. Conclusions et perspectives

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que l'expression journalière des gènes horloges et de gènes de sortie de l'horloge au sein des SCN dépend des conditions photopériodiques. Il apparaît qu'une SP induit toujours une diminution d'expression de *Clock* et, dans certains cas, de *Bmal1*, ce qui a très certainement pour conséquence la diminution d'expression observée globalement (en termes d'amplitude et/ou de durée) des autres gènes horloges. Ainsi, bien que la période soit toujours égale à 24 h, les oscillations des boucles moléculaires et de leurs sorties, sont amorties en SPacc. Ce résultat obtenu chez les hamsters syriens et d'Europe et confirmé chez d'autres espèces, montre que l'horloge principale est affectée par les conditions photopériodiques. Nous avons également montré que le temps nécessaire au passage d'une expression de type LPacc au type SPacc par les gènes de l'horloge est rapide et ne dépend pas de la présence de mélatonine. Quant aux modifications de l'expression des gènes de sortie de l'horloge induites par une SP, il apparaît rapidement un état intermédiaire qui est donc sous l'unique dépendance de la photopériode (directement ou par l'intermédiaire des gènes horloges), alors que l'acquisition du profil SPacc apparaît plus tardivement et nous ne pouvons pas totalement exclure que la mélatonine participe à cette variation. Cependant, comme la mélatonine ne provoque aucun changement de l'expression des gènes horloges ou de l'*Avp* à court terme, cela renforce l'idée qu'elle ne participerait pas à l'intégration d'une nouvelle photopériode par les SCN. Nous avons donc observé que l'apparition des profils d'expression de type SPacc est rapide en terme de gènes horloges et lentes en terme de gènes de sortie de l'horloge montrant ainsi que ***l'horloge intègre la photopériode et construit des messages photopériodiques***. Nous avons également observé, chez le hamster syrien, que l'expression journalière du gène *Clock* qui est élevée et indépendante du temps au cours d'un cycle en LPacc, est rythmique en SPacc par apparition de valeurs basses puis devient de nouveau indépendante du temps avec des valeurs toujours faibles en SP-R. Si l'apparition de la rythmicité est rapide, l'acquisition du profil SPacc est bien plus lente. Ainsi, les SCN sont à la base de la construction des messages journalier et saisonnier et le gène *Clock* semble être responsable de la construction des messages saisonniers SPacc et SP-R.

Le rythme d'activité locomotrice des animaux est sous le contrôle des SCN et il avait été proposé que le TGF α participe à ce contrôle. Or, le rythme d'activité locomotrice dépend de la photopériode. Nous avons comme projet d'étudier la possibilité que l'expression du *Tgfa* dépende des conditions photopériodiques et soit corrélée à la forme des rythmes d'activité locomotrice. Mais, nous avons renoncé à tester cette hypothèse car, la comparaison de son

profil d'expression entre un rongeur à activité diurne et un à activité nocturne, a montré qu'il est plus probable que le $TGF\alpha$ joue un rôle dans la synchronisation des neurones des SCN que dans le contrôle de l'activité locomotrice.

Les SCN construisent des messages journaliers différents en fonction des conditions photopériodiques. La mélatonine est le principal relai hormonal de diffusion des messages photopériodiques. Le tissu cible de la mélatonine que nous avons choisi d'étudier est la PT. Nous avons montré que l'expression des gènes horloges dans cette structure dépend de l'environnement photopériodique. De plus, par différents protocoles d'administration de mélatonine exogène, nous avons mis en évidence le fait que *la mélatonine permet une augmentation rapide de la quantité d'ARNm de Cry1 et une inhibition des pics d'expression des autres gènes horloges dans la PT*. A l'inverse, l'absence de mélatonine le jour des prélèvements, abolit la rythmicité de l'expression de *Cry1* mais est sans effet sur celle des autres gènes. Ainsi, nos résultats montrent clairement des effets directs et opposés de la mélatonine sur l'expression des gènes horloges dans la PT. Comme l'expression de tous les gènes horloges à l'exclusion de *Cry1* reste rythmique en absence de mélatonine, nos résultats sont en faveur de la présence d'horloges endogènes dans les cellules de la PT.

A partir de l'ensemble de ces résultats et des données de la littérature, de nombreuses perspectives sont envisageables. Comme les études dans le domaine des rythmes saisonniers reviennent très souvent à comparer deux situations circadiennes, une première partie de notre discussion sera consacrée aux relations entre les données moléculaires circadiennes et les informations que l'on pourrait en déduire en terme saisonnier. Une seconde partie sera dédiée au gène *Clock* et à sa régulation journalière possible comme à son mode d'action hypothétique. Enfin, une troisième partie concernera le décodage de la photopériode par la PT.

1. Du circadien au saisonnier.

Les SCN intègrent les variations photopériodiques et construisent un message saisonnier, mais les mécanismes sous-jacents par lesquels ce message est construit restent encore à définir.

1.1. CODAGE DE LA PHOTOPERIODE PAR LES SCN.

1.1.1. Au niveau moléculaire.

Dans l'introduction générale, nous avons vu que les boucles moléculaires présentent d'importantes régulations en terme circadien. En revanche, en terme saisonnier, nous avons juste montré que les niveaux d'ARNm varient en fonction des conditions photopériodiques. Il est fort probable que d'autres régulations journalières puissent, elles-aussi, être sensibles aux conditions photopériodiques. Une caractérisation photopériodique plus approfondie des états d'activité de chacun des acteurs intervenant dans la régulation circadienne, sera nécessaire pour mieux élucider les raisons pour lesquelles les pics d'expression de *Per1,2,3* varient en durée et pas celui de *Cry1* (résultat [chapitre D.1.1.](#)), les pics d'expression de *Per2,3* sont modifiés en moins de 21 jours et pas celle celui de l'*Avp* (résultat [chapitre D.2.1.](#)). L'étude des états d'activité de différentes protéines intervenant dans le contrôle de la transcription des gènes pourraient expliquer ces différences. Par exemple, l'étude de l'état d'activation de WDR5 (voir [chapitre A.1.3.2.1.](#) et Wysocka *et al.*, 2005), les fluctuations de présence de DBP/E4BP4 pourraient expliquer les différences observées entre les pics de *Per2* et *Rev-erba* et entre *Per2* et *Avp*, respectivement. Il serait également intéressant de caractériser si la photopériode influe sur les effets des diverses protéines intervenant dans les contrôles post-transcriptionnels et post-traductionnels (voir [chapitre A.1.3.2.](#) et Yamamoto *et al.*, 2005 ; Nishii *et al.*, 2006).

1.1.2. Au niveau cellulaire.

L'une des hypothèses pour expliquer la mesure du temps photopériodique est la présence de deux oscillateurs, l'un du matin (M) et l'autre du soir (E) (pour détails, voir introduction, [chapitre A.2.2.2.](#) et discussion, [chapitre D.1.1.3.](#)). En résumé, ce modèle stipule que la relation de phase entre les pics de présence des dimères PER1/CRY1 (M) et PER2/CRY2 (E) varie au cours des saisons et serait à la base de la construction d'un message photopériodique. Les données mesurées par de la Iglesia et coll. (2004) valident l'hypothèse d'un tel modèle. Dans leur étude, ils montrent que le décalage de phase entre les pics d'ARNm de *Per1* et de *Per2* est plus important (de 60%) en photopériode longue que courte (3.6h en LP contre 2.20 en SP). En revanche, nos résultats ([chapitre D.1.1.](#)) ne correspondent pas entièrement à ce modèle : le pic d'ARNm de *Cry1* est centré sur la transition jour/nuit et non sur la transition nuit/jour ce qui n'est pas compatible avec l'implication de *Cry1* comme composant de l'oscillateur du matin. Ainsi, le modèle E/M avec les dimères PERs/CRYs comme support ne peut expliquer la mesure du temps photopériodique. Il reste donc à savoir si chaque cellule est compressée/décompressée en fonction de la photopériode (modèle durée) ou si les différences de phase changent en fonction de la photopériode (modèle couplage). Or, les résultats que nous avons obtenus peuvent s'expliquer aussi bien par l'une que par l'autre de ces hypothèses.

De plus, des données récentes montrent que l'intégration de la photopériode par les SCN n'est certainement pas effectuée de façon homogène par les SCN. En effet, chez le hamster sibérien et la souris, les variations photopériodiques des profils d'expression des gènes horloges seraient différentes entre les parties rostrales et caudales des SCN (Hazlerigg *et al.*, 2005 ; Hut, 2006). La phase des pics d'ARNm des gènes horloges semble plus fortement affectée par la photopériode, dans la partie caudale des SCN que dans leur partie rostrale. Ainsi, l'existence du modèle "couplage" semble être confirmée. Cependant, cela n'exclut pas qu'un changement photopériodique s'intègre à la fois par les décalages de phase entre cellules et par une variation de la durée (et/ou l'amplitude) d'activité journalière de chaque cellule. Une analyse des rythmes de luciférase, à l'aide d'une caméra CCD, chez les souris *Per1::LUC* ou *PER2::LUC* montrera alors l'existence du modèle "durée".

1.2. CONCLUSIONS.

L'intégration de la photopériode par les SCN peut donc trouver son origine tant au niveau moléculaire que cellulaire. Nous avons évoqué (discussion [chapitre D.1.2.](#)) que la construction de message(s) photopériodique(s) par les SCN, semble s'effectuer différemment en fonction de la région des SCN. Parmi les conséquences de ces changements de fonctionnement des SCN, on note une augmentation de la durée de sécrétion de mélatonine et une variation du rythme d'activité locomotrice. Les mécanismes probables permettant les adaptations des SCN aux variations photopériodiques sont présentés [figure 62](#).

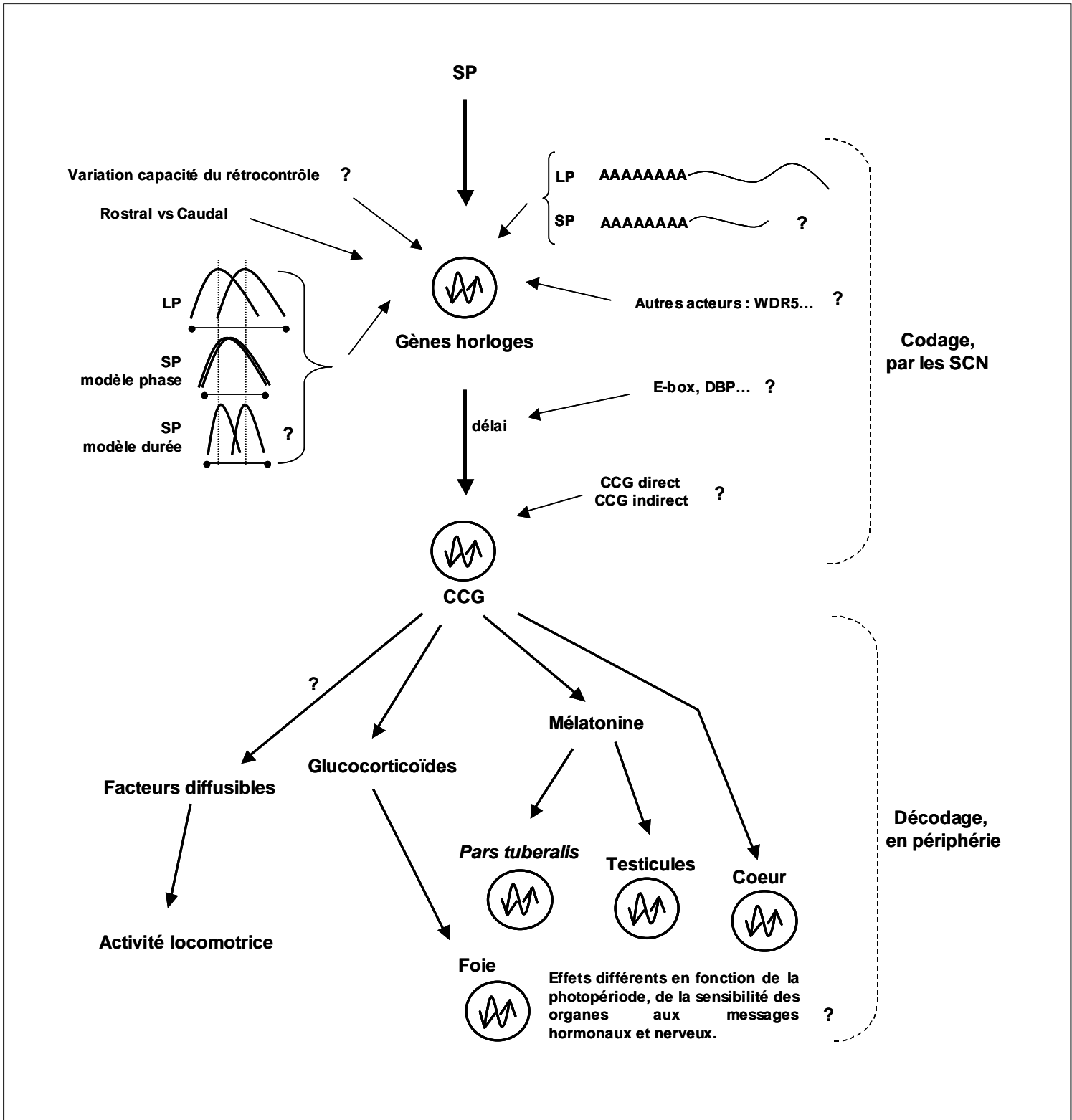


Figure 62 : Résumé des mécanismes pouvant intervenir dans le codage et le décodage de l'information photopériodique.

Les flèches courbes dans les cercles représentent une expression journalière des gènes, dépendante de la photopériode.

2. *Clock*, un gène à la base des rythmes saisonniers.

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'expression du gène *Clock* dans les SCN laissent supposer que ce gène joue un rôle prépondérant dans le déterminisme des physiologies de type SPacc et SP-R. Des études portant sur l'implication particulière de ce gène vont être proposées.

2.1. REGULATION DE LA PRESENCE DES ARNm DE CLOCK.

Les mécanismes permettant l'apparition du profil de type SP-R pour la présence des ARNm de *Clock* sont bien évidemment encore inconnus. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Il est possible que la mélatonine exerce un effet cumulatif permettant alors à long terme, de diminuer les niveaux de *Clock*. Ceci peut expliquer pourquoi l'apparition du profil SPacc comme celui en SP-R, n'intervient que tardivement. Cela permettrait également d'expliquer pourquoi la mélatonine n'a pas ou très peu d'effets à court terme sur l'expression des gènes horloges (résultat [chapitre D.2.2.](#)) en dépit de la présence de ses récepteurs, dans les SCN de la majorité des espèces étudiées. Chez le hamster syrien, le suivi des niveaux d'ARNm de *Clock*, après pinéalectomie puis transfert en SP, permettra de voir si la mélatonine joue un rôle dans ces modifications à long terme des niveaux d'ARNm de *Clock*. De plus, comme différentes populations cellulaires existent tant au niveau histochimique que fonctionnel, une régionalisation des cellules exprimant *Clock* (non observable en hybridation *in situ* radioactive mais révélée par des doubles hybridations *in situ* non radioactives), permettra de déterminer quels types cellulaires (neurones à *Avp*, *Vip* ou à *Calb*) sont plus particulièrement affectés par ces modifications.

Au niveau moléculaire, il est possible que l'activité transcriptionnelle de *Clock* ne varie pas au cours du temps (journalier et saisonnier) mais que les ARNm codant CLOCK soient une cible de dégradation spécifique. Nous avons vu que la NOCTURNIN a la capacité de dégrader des ARNm (voir [chapitre A.1.3.2.](#)). Une autre molécule pourrait également être ciblée. Chez les procaryotes, la RIBONUCLEASE III (ou ARNase III) intervient dans le contrôle de la maturation des ARN (Nicholson, 1999). Il semble que chez les eucaryotes, cette protéine ait le même rôle (Wu *et al.*, 2000 ; Provost *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003 ; Cullen, 2004). Récemment, la transcription de la *Ribonucléase III* a été montrée comme étant

rythmique de façon endogène (Bhogal *et al.*, 2004). Son rôle précis dans le domaine des rythmes tout comme ses voies de régulation ne sont pas encore connus. Cependant, elle pourrait intervenir, comme la NOCTURNIN, dans le contrôle post-transcriptionnel des gènes horloges, mais au niveau de la maturation de leurs ARNm. Si l'on compare ces hypothèses à ce qui est connu chez la drosophile et chez les plantes, elles apparaissent fortement probables. Chez la drosophile, l'UTR 3' de *Per1* joue un rôle dans la période d'activité (Chen *et al.*, 1998) et chez les plantes, plusieurs gènes contrôlés par l'horloge, présentent des variations journalières de la stabilité de leurs ARNm, ceci est dû, au moins en partie, à la fixation sur l'ARN d'un élément déstabilisant (Lidder *et al.*, 2005). Comme de nombreux mécanismes moléculaires sont comparables entre plantes, drosophile et mammifères, la présence d'une régulation post-transcriptionnelle chez les mammifères, doit être fortement suspectée et son importance évaluée. Ainsi, sur des coupes sériées provenant d'animaux transférés en SP après ou sans pinéalectomie, il sera intéressant de montrer (1) si les expressions de *Nocturnin* et des gènes codant différentes ARNases, dépendent des conditions à la fois photopériodique et de mélatonine et (2) si la présence des ARN non matures de *Clock*, suit les mêmes variations que celles des ARN matures de *Clock*.

2.2. CONSEQUENCES DE CETTE ADAPTATION.

La question se pose de savoir pourquoi la diminution d'expression de *Clock* entre LPacc et SPacc semble retentir sur la diminution d'expression des gènes horloges *Pers* et *Rev-erba* et aussi de l'*Avp*, alors que la diminution de cette expression entre SPacc et SP-R n'a aucun effet (résultats chapitre D.2.1.). Donc, la diminution des quantités de *Clock* (1) en SPacc serait responsable de la diminution d'expression des autres gènes horloges et de la construction d'un message photopériodique de type SP, et (2) celle observée en SP-R pourrait être à la base de la construction d'un message différent permettant la reprise de l'activité sexuelle et celle, en périphérie, d'un fonctionnement journalier de type LP (voir chapitre A.2.5.). Une donnée importante à mentionner, est que le passage des niveaux élevés en LP à des niveaux faibles en SP-R, s'effectue d'une manière dépendante du temps circadien (apparition d'un rythme sur 24 heures) et saisonnier (modifications des profils de présence de façon non proportionnelle à la durée passée en SP). Par analogie avec le contrôle de la synthèse de mélatonine faisant intervenir des messages activateurs et inhibiteurs en sortie des SCN et aussi différentes populations cellulaires (Perreau-Lenz *et al.*, 2005), il est probable que le contrôle de l'expression des gènes horloges dans les organes périphériques soit sous l'influence de

différentes voies activatrices/inhibitrices dont la mise en œuvre est contrôlée par le gène *Clock*. Il sera donc intéressant de rechercher au sein même des SCN, des gènes de sortie spécifiques de l'état SP-R, dont l'expression est non modifiée après transfert des animaux en SP, mais augmentée/diminuée en SP-R.

3. La *Pars tuberalis*, un modèle d'études...

La PT est l'un des tissus les plus utilisés pour étudier le décodage du signal mélatoninergique. Comme ce tissu exprime les gènes horloges, nous avons cherché si la mélatonine induit une variation de leur expression. Aussi, nous avons montré que ces expressions dépendent des concentrations circulantes en mélatonine (été vs hiver, diminution de ces niveaux vs augmentation). Cependant, les mécanismes de décodage de ce signal et de dépendance de la PT à la mélatonine ne sont pas encore entièrement compris. D'une part, le modèle de coïncidence interne, appliqué au décodage du signal photopériodique, présente certaines limites pour expliquer nos résultats. D'autre part, la présence d'une horloge moléculaire au sein des cellules de la PT semble être de plus en plus évidente.

3.1. MODELE DE COÏNCIDENCE INTERNE.

Le modèle de coïncidence interne appliqué à la PT, a été décrit au [chapitre A.2.4.3.3.](#) Rappelons que, chez le mouton, le modèle suppose une variation de la relation de phase entre les pics de PER1 et de CRY1, permettant ainsi une augmentation de la quantité de dimères formés en SP (modèle "phase"). Chez les hamsters, syrien et sibérien, une diminution des quantités de PER1 en SP serait à l'origine de l'adaptation photopériodique de la PT (modèle "amplitude"). En fonction de nos résultats, plusieurs limites doivent cependant être apportées à ces modèles :

(1) Il convient de remarquer que, dans le cas du mouton, le nombre de dimères PER1/CRY1 serait augmenté en SP alors que dans le cas des hamsters sibérien et syrien, les quantités de PER1 seraient diminuées en SP. Mais, pour les deux cas, il en résulterait la même conséquence : une diminution des quantités de PRL produite. Il est bien entendu possible que des mécanismes additionnels interviennent pour expliquer cette même conséquence (diminution de PRL) avec des causes opposées (augmentation de PER1/CRY1 ou diminution de PER1), mais aucun support n'a encore été trouvé pour ces mécanismes additionnels. Existents-ils seulement ?

(2) Le modèle "phase" de coïncidence interne chez le mouton, a été construit à partir de résultats expérimentaux concernant de nombreux gènes horloges et dans deux conditions photopériodiques tandis que le modèle "amplitude" chez le hamster syrien, n'est étayé en terme d'expression de gènes horloges, que par les résultats obtenus pour le gène *Per1*. Il se

pourrait en effet que les relations de phase entre les pics d'expression de *Per1* et de *Cry1* varient également en fonction de la photopériode chez les rongeurs. La description de deux modèles différents est-elle justifiée ?

Nos résultats peuvent apporter des indications quant à la validité de ces modèles et aux mécanismes supposés. Chez le hamster d'Europe, l'expression de *Cry1* est modifiée par une réduction de la photopériode, avec une augmentation de la durée et une avance de phase (par rapport au milieu de la nuit) du pic d'ARNm. Chez le hamster sibérien, cette avance de phase est également observée mais n'est pas accompagnée d'une augmentation de la durée d'expression (Johnston *et al.*, 2005). Chez le hamster syrien, aucune donnée concernant l'expression de *Cry1* en fonction de la photopériode n'a encore été décrite dans la littérature. Ainsi, dans les deux cas où l'expression de *Cry1* a été étudiée, un effet sur la phase du pic d'ARNm a été décrit. En ce qui concerne l'expression de *Per1*, elle est faible et arythmique chez le hamster sibérien, mais toujours rythmique et centrée sur le début de jour chez les hamsters syrien et européen. Ainsi, le modèle "amplitude" repose seulement sur la diminution d'amplitude observée chez le hamster sibérien. En considérant l'ensemble des résultats, il apparaît que le hamster d'Europe présente une adaptation suivant le modèle "phase" ; chez le hamster sibérien, le modèle "amplitude" est sous-jacent en ce qui concerne *Per1* et c'est le modèle "phase" qui prédomine en ce qui concerne *Cry1* ; chez le hamster syrien, le modèle "amplitude" est également retrouvé en ce qui concerne *Per1* mais nous ne pouvons pas encore déterminer si le modèle "phase" se manifeste également chez cette espèce. Si l'on considère les données rapportées chez le mouton, le modèle "phase" est accepté et a été plusieurs fois décrit. Notons tout de même qu'une diminution de l'amplitude du pic de *Per1* a été rapportée en SP dans deux études différentes (Morgan *et al.*, 1998 ; Lincoln *et al.*, 2002). Ainsi, la PT du mouton présente à la fois le modèle "phase" et le modèle "amplitude". De ce fait, les limites décrites en (1) et (2) ne semblent pas réellement exister. Même si de nouvelles études semblent nécessaires, on peut d'ores et déjà supposer que les deux modèles co-existent chez toutes les espèces. Une analyse de l'expression photopériodique des gènes horloges chez une autre espèce, mais aussi l'étude des variations d'expression de *Cry1* chez le hamster syrien, devraient permettre d'affiner et de confirmer la coexistence des deux modèles dans la PT, qui n'en formeraient alors plus qu'un seul.

Un point supplémentaire restera cependant à éclaircir. Le modèle "phase" suppose une variation photopériodique du décalage de phase entre les pics de *PER1* et de *CRY1* permettant la formation de plus ou de moins de dimères. Ce modèle prévoit une diminution de

ce décalage en SP mais ceci n'est valable que si le pic de PER1 précède celui de CRY1, c'est à dire, en considérant l'arrivée du jour comme référence (voir [figure 63](#)). A l'inverse, si l'arrivée de la nuit est primordiale, il y aura, une augmentation de décalage de phase entre les pics de CRY1 et de PER1 en SP. Or, nous avons montré qu'une injection de mélatonine à n'importe quelle heure induit une augmentation des quantités d'ARNm de *Cry1* et une diminution au moment de leur pic de celles des autres gènes. Par ailleurs, la suppression de la mélatonine n'inhibe pas l'expression de ces gènes (sauf celle de *Cry1*). Ainsi, il paraît plus probable que l'arrivée de la nuit (donc l'arrivée de la mélatonine) soit l'événement circadien le plus important dans la régulation de l'expression des gènes horloges dans la PT. En considérant cette nouvelle hypothèse, le nombre de dimères CRY1/PER1 formés sera donc réduit en SP et non augmenté. De plus, elle est en concordance avec la diminution des quantités d'ARNm de *Per1* formés en SP. Pour confirmer cette nouvelle hypothèse, une mise en évidence des quantités de CRY1/PER1 formés en fonction du temps circadien et saisonnier est nécessaire.

3.2. MODELE D'HORLOGES MOLECULAIRES.

Nos données obtenues dans la PT de mouton ([chapitre D.4.2.](#)) suggèrent la possibilité que les cellules de la PT possèdent une horloge endogène. En effet, si les cellules de la PT présentent chacune une horloge moléculaire, elles seraient synchronisées par la mélatonine mais, cette dernière n'induirait pas la rythmicité. A l'inverse, si la rythmicité de l'expression des gènes horloges mesurée dans la PT est induite par la mélatonine, en l'absence de celle-ci aucune variation endogène de l'expression des gènes horloges ne pourrait être mise en évidence.

A Aberdeen, nous avons montré chez le mouton et plus récemment chez le hamster sibérien (voir [figure 64](#) ; article en préparation n°4) que l'expression des gènes horloges reste rythmique (sauf dans le cas du gène *Cry1*) lorsque les animaux sont placés en conditions LL le jour des prélèvements. En l'absence de signal mélatoninergique, les cellules de la PT ont donc la possibilité d'exprimer, en phase les unes avec les autres, les gènes horloges. Cependant, une absence prolongée de mélatonine (par pinéalectomie) inhibe l'expression de *Per1* (Messager *et al.*, 2001 ; von Gall *et al.*, 2002). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'absence du signal synchronisateur des cellules de la PT, avec pour conséquence, l'abolition apparente de la rythmicité de *Per1*. Ainsi, la PT serait constituée de cellules présentant des horloges moléculaires mais dont la synchronisation par la mélatonine est essentielle à

l'apparition d'une rythmicité cohérente au niveau tissulaire. Afin de confirmer définitivement la présence d'horloges moléculaires dans la PT, il serait intéressant d'enregistrer avec une caméra CCD les rythmes de l'activité de luciférase sur des cellules de PT provenant de rats transgéniques *Per1::LUC* (origine des rats : Yamazaki et al., 2000).

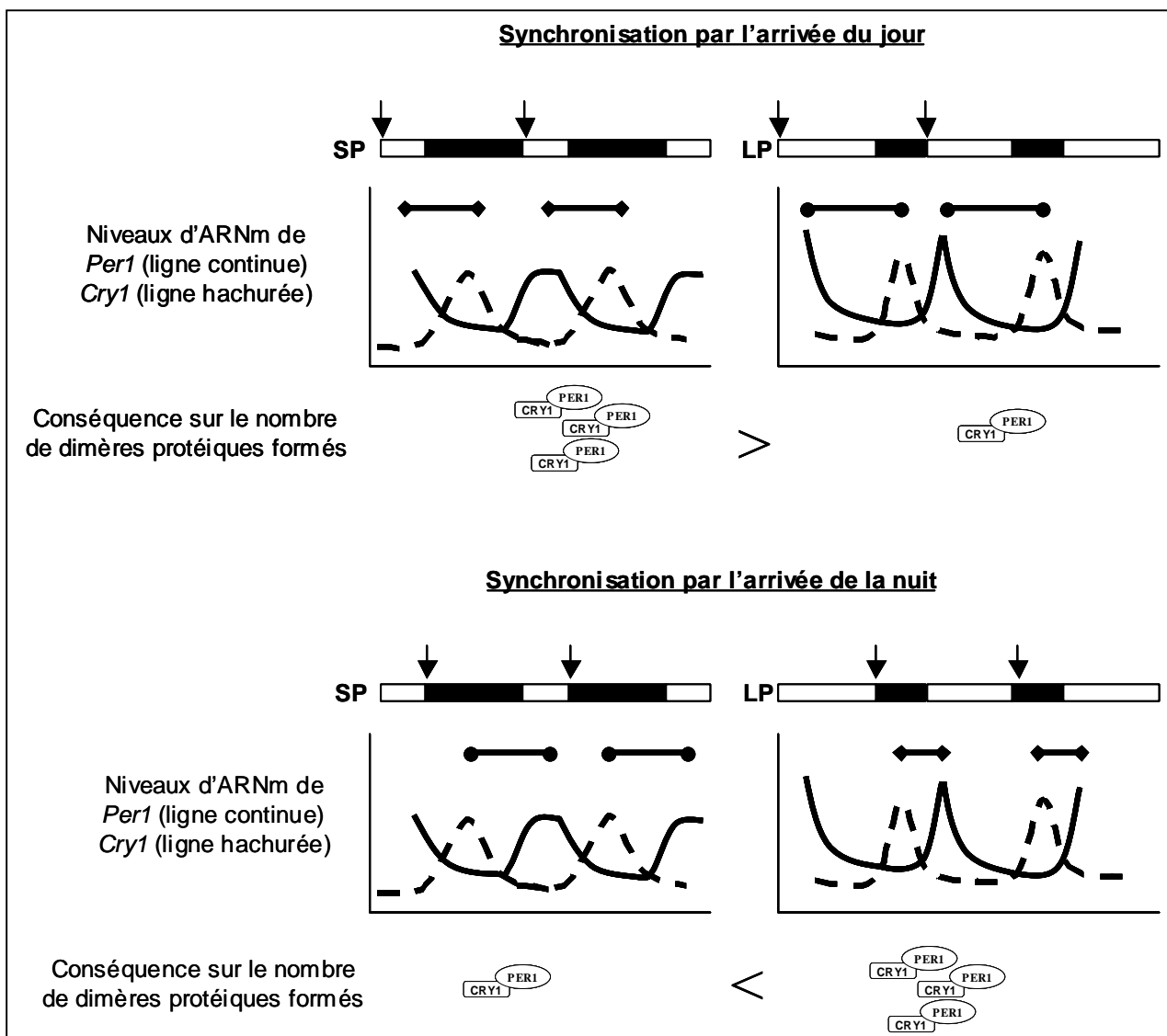


Figure 63 : L'expression des gènes horloges dans la PT est synchronisée par l'arrivée du jour ou par l'arrivée de la nuit.

L'expression des gènes horloges dans la PT est soit synchronisée par l'arrivée du jour soit par l'arrivée de la nuit. Ces deux modèles ont des conséquences opposées quant à la formation des dimères PER1/CRY1.

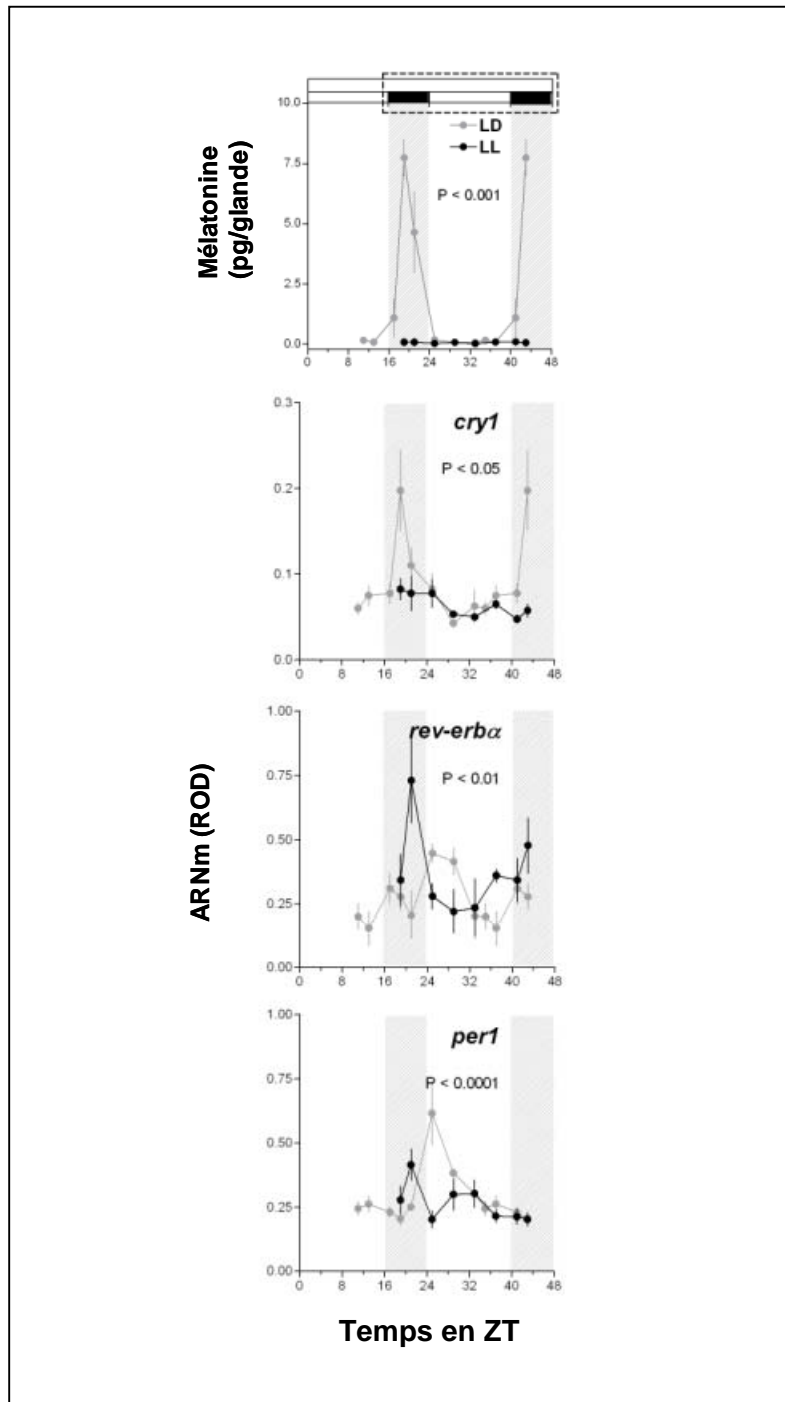


Figure 64 : Effet de la suppression à cours terme de la mélatonine sur l'expression des gènes horloges dans la PT du hamster sibérien.

Les hamsters sibériens sont élevés en LP16:8 (en gris) et un groupe a été placé en LL le jour des prélèvements (en noir). **En haut**, est représenté le profil journalier de mélatonine dans les deux conditions. **En bas**, sont représentés les profils de quantification des ARNm, effectués à partir de plan film d'hybridation *in situ*. Les valeurs représente la moyenne \pm SEM de 4 animaux. Le résultat de l'interaction temps*photopériode (ANOVA deux facteurs) est indiqué par la valeur p. Les périodes d'obscurité correspondantes à la condition LP sont indiquées par les barres verticales grises. En abscisse, le temps LL0 correspond au temps ZT0.

Epilogue

Vers de nouvelles échelles de temps...

Au cours de ce manuscrit, nous avons montré que les comportements rythmiques journaliers et saisonniers, sont sous la dépendance d'une horloge centrale contenue dans les SCN qui permet la synchronisation des horloges moléculaires des cellules des tissus périphériques sur ces deux échelles de temps. Il en résulte une organisation temporelle harmonieuse des fonctions physiologiques et comportementales de l'organisme. Ainsi, les SCN prennent une part active à la définition des moments d'activité journaliers de *A. ansorgei*, du moment de la reproduction du hamster syrien ou encore de la mue du pelage du mouton...

Cependant, dans la nature, les animaux n'ont pas une vie, uniquement rythmée par l'alternance jour/nuit et par la succession des saisons. En effet, de nombreuses fonctions physiologiques et comportementales se répètent plusieurs fois, au cours de la journée ou plusieurs fois au cours d'une année. Notons, par exemple, la prise alimentaire chez la chouette effraie s'effectuant deux fois par jour, la période des cycles menstruels chez la femme de l'ordre de 28 jours. Ces rythmes pourraient-ils dépendre eux-aussi des gènes horloges ? De façon plus générale, les gènes horloges pourraient-ils intervenir dans l'apparition de comportements sur d'autres échelles de temps que circadienne ou circannuelle ? Dans certaines régions du cerveau du rat (noyau central de l'amygdale, noyau oval de la strie terminale), PER2 présente une expression journalière rythmique qui dépend d'une échelle de temps...*infradienne*. En effet, en fonction des phases du cycle oestrien, l'amplitude du rythme de PER2 est plus ou moins élevée spécifiquement dans ces zones ; alors qu'aucun effet n'est observé dans les SCN (Perrin *et al.*, 2006). Chez la drosophile, la période de rythmes d'activité *ultradiens* est fonction du génotype de l'animal, en terme d'allèle du gène *Per* (Power *et al.*, 1995).

Ainsi, il apparaît fort probable que les gènes horloges jouent des rôles importants dans l'établissement des rythmicités sur diverses échelles de temps. Nous avons montré que *Clock* est très certainement le gène le plus important à l'établissement des rythmes saisonniers. Les rôles plus ou moins redondants des gènes *Pers* et *Crys* en terme circadien, pourraient peut-être ainsi trouver une légitimité sur d'autres échelles de temps...

F. Références bibliographiques

A

- Abe H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M & Honma K. (1998). Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci. Lett.* 258, 93-6.
- Abe M, Herzog ED & Block GD. (2000). Lithium lengthens the circadian period of individual suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroreport* 11, 3261-4.
- Abrahamson EE & Moore RY. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916, 172-91.
- Agez L, Laurent V, Pévet P, Masson-Pévet M & Gauer F. (2006a). Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *submitted*.
- Agez L, Laurent V, Bonn D, Senser A, Pévet P, Masson-Pévet M & Gauer F. (2006b). Melatonin directly regulates the mRNA nuclear orphan receptors expression rhythms in the rat pars tuberalis not in the suprachiasmatic nuclei. *in preparation*.
- Ahlersova E, Ahlers I & Smajda B. (1991). Influence of light regimen and the time of year on circadian oscillations of thyroid hormones in rats. *Physiol. Res.* 40, 305-15.
- Ahlersova E, Ahlers I, Kassayova M & Smajda B. (1997). Circadian oscillations of serum thyroid hormones in the laboratory rat: the effect of photoperiods. *Physiol. Res.* 46, 443-9.
- Akashi M & Nishida E. (2000). Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* 14, 645-9.
- Akashi M & Takumi T. (2005). The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 441-8.
- Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T & Nishida E. (2002). Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1693-703.
- Akashi M, Ichise T, Mamime T & Takumi T. (2006). Molecular mechanism of cell-autonomous circadian gene expression of period2, a crucial regulator of the mammalian circadian clock. *Mol. Biol. Cell.* 17, 555-65.
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH & Kyriacou CP. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.* 12, 540-50.
- Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, Maetani M, Watanabe S, Tei H, Sakaki Y & Shibata S. (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J. Neurosci.* 19, 1115-21.
- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G & Lee CC. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* 91, 1055-64.
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS & Lee CC. (2001). mPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 16, 100-4.
- Albus H, Bonnefont X, Chaves I, Yasui A, Doczy J, van der Horst GT & Meijer JH. (2002). Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr. Biol.* 12, 1130-3.
- Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD & Meijer JH. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol.* 15, 886-93.
- Allen GC & Earnest DJ. (2004). Overlap in the distribution of TrkB immunoreactivity and retinohypothalamic tract innervation of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 376, 200-4.
- Allen GC, Qu X & Earnest DJ. (2005). TrkB-deficient mice show diminished phase shifts of the circadian activity rhythm in response to light. *Neurosci. Lett.* 378, 150-5.
- Ang VT & Jenkins JS. (1982). Blood-cerebrospinal fluid barrier to arginine-vasopressin, desmopressin and desglycinamide arginine-vasopressin in the dog. *J. Endocrinol.* 93, 319-25.

Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH & Takahashi JS. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655-67.

Arendt J & Skene DJ. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 9, 25-39.

Arima H, House SB, Gainer H & Aguilera G. (2002). Neuronal activity is required for the circadian rhythm of vasopressin gene transcription in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Endocrinology* 143, 4165-71.

Armstrong SM & Redman J. (1985). Melatonin administration: effects on rodent circadian rhythms. In: Evered D, Clarke S, editors. *Photoperiodism, melatonin and the pineal*. London: Pitman 188-207.

Asai M, Yoshinobu Y, Kaneko S, Mori A, Nikaido T, Moriya T, Akiyama M & Shibata S. (2001). Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J. Neurosci. Res.* 66, 1133-9.

Aton SJ & Herzog ED. (2005). Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron* 48, 531-4.

Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J & Herzog ED. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 476-83.

Audic Y & Hartley RS. (2004). Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol. Cell.* 96, 479-98.

B

Badura LL & Goldman BD. (1992). Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res.* 598, 98-106.

Bae K & Weaver DR. (2001). Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2. *J. Biol. Rhythms* 18, 123-33.

Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM & Weaver DR. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525-36.

Baggs JE & Green CB. (2003). Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr. Biol.* 13, 189-98.

Balsalobre A, Damiola F & Schibler U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-37.

Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G & Schibler U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-7.

Barrandon Y & Green H. (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50, 1131-7.

Bartness TJ, Goldman BD & Bittman EL. (1991). SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* 260, 102-12.

Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL & Goldman BD. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J. Pineal Res.* 15, 161-90.

Baum MJ & Goldfoot DA. (1974). Effect of hypothalamic lesions on maturation and annual cyclicity of the ferret testis. *J. Endocrinol.* 62, 59-73.

Beasley LJ, Pelz KM & Zucker I. (1984). Circannual rhythms of body weight in pallid bats. *Am. J. Physiol.* 246, 955-8.

Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH & Carlberg C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269, 28531-4.

Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH & Carlberg C. (1997). Additions and corrections to Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 272, 16707.

Beelman CA & Parker R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81, 179-83.

Begeot M, Hemming FJ, Dubois PM, Combarnous Y, Dubois MP & Aubert ML. (1984). Induction of

- pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone alpha subunit. *Science* 226, 566-8.
- Bergmann M, Wittkowski W & Hoffmann K. (1989). Ultrastructural localization of thyrotropin (TSH)-like immunoreactivity in specific secretory cells of the hypophyseal pars tuberalis in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res.* 256, 649-652.
- Berson DM. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26, 314-20.
- Berson DM, Dunn FA & Takao M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070-3.
- Bhogal RK, Mitchell AL & Coen CW. (2004). Identification of putative rat ribonuclease III by differential display: a novel rat mRNA expressed in a circadian manner in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 131, 51-7.
- Biello SM, Golombek DA, Schak KM & Harrington ME. (1997). Circadian phase shifts to neuropeptide Y. In vitro: cellular communication and signal transduction. *J. Neurosci.* 17, 8468-75.
- Bittman EL. (1978). Hamster refractoriness: the role of insensitivity of pineal target tissues. *Science* 202, 648-50.
- Bittman EL, Kaynard AH, Olster DH, Robinson JE, Yellon SM & Karsch FJ. (1985). Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 40, 409-18.
- Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC & Staels B. (2002). PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 7-18.
- Bockers TM, Niklowitz P, Bockmann J, Fauteck JD, Wittkowski W & Kreutz MR. (1995). Daily melatonin injections induce cytological changes in pars tuberalis-specific cells similar to short photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* 7, 607-613.
- Bockers TM, Bockmann J, Fauteck JD, Wittkowski W, Sabel BA & Kreutz MR. (1996). Evidence for gene transcription of adeno-hypophyseal hormones in the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 63, 16-27.
- Bockers TM, Bockmann J, Salem A, Niklowitz P, Lerchl A, Huppertz M, Wittkowski W & Kreutz MR. (1997). Initial expression of the common alpha-chain in hypophyseal pars tuberalis-specific cells in spontaneous recrudescence hamsters. *Endocrinology* 138, 4101-8.
- Bockmann J, Bockers TM, Vennemann B, Niklowitz P, Muller J, Wittkowski W, Sabel B & Kreutz MR. (1996). Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* 137, 1804-1813.
- Bockmann J, Kreutz MR, Wittkowski W & Bockers TM. (1997). TSH expression in murine hypophyseal pars tuberalis-specific cells. *Acta. Anat. (Basel)* 160, 189-194.
- Boissin J & Canguilhem B. (1998). Les rythmes du vivant, origine et contrôle des rythmes biologiques. Paris, Nathan université.
- Boissin-Agasse L, Richard P & Boissin J. (1985). Testicular activity of the ferret kept for over 4 years under permanent light and constant temperature. *C. R. Acad. Sci. III.* 300, 685-90.
- Boissin-Agasse L, Jacquet JM, Lacroix A & Boissin J. (1986). Circadian participation in the photoregulation of testis activity and prolactin secretion in the mink, a short-day breeder. *J. Biol. Rhythms* 1, 231-41.
- Bothorel B, Barassin S, Saboureau M, Perreau S, Vivien-Roels B, Malan A & Pevet P. (2002). In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1090-98.
- Bouskila Y & Dudek FE. (1993). Neuronal synchronization without calcium-dependent synaptic transmission in the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3207-10.
- Brown SA, Ripperger J, Kadener S, Fleury-Olela F, Vilbois F, Rosbash M & Schibler U. (2005). PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator. *Science* 308, 693-6.
- Buijs RM & Kalsbeek A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 521-6.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS & Bradfield CA. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009-17.
- Burd CG & Dreyfuss G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-21.

Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF & Camper SA. (1999). Genealogy of the anterior pituitary gland: tracing a family tree. *Trends Endocrinol. Metab.* 10, 343-352.

Burrows RC, Levitt P & Shors TJ. (2000). Postnatal decrease in transforming growth factor alpha is associated with enlarged ventricles, deficient amygdaloid vasculature and performance deficits. *Neuroscience* 96, 825-36.

Butcher GQ, Dziema H, Collamore M, Burgoon PW & Obrietan K. (2002). The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J. Biol. Chem.* 277, 29519-25.

Butcher GQ, Lee B, Hsieh F & Obrietan K. (2004). Light- and clock-dependent regulation of ribosomal S6 kinase activity in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 907-15.

C

Cagampang FR, Yang J, Nakayama Y, Fukuhara C & Inouye ST. (1994). Circadian variation of arginine-vasopressin messenger RNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24, 179-84.

Cailotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M, Pevet P & Buijs RM. (2005). The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur. J. Neurosci.* 22, 2531-40.

Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pevet P & Challet E. (2002). Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 116, 583-91.

Camacho F, Cilio M, Guo Y, Virshup DM, Patel K, Khorkova O, Styren S, Morse B, Yao Z & Keesler GA. (2001). Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett.* 489, 159-65.

Camargo CR, Colares E & Castrucci AM. (2006). Seasonal pelage color change: news based on a south american rodent. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 77-86.

Canaple L, Rambaud J, Dkhissi-Benyahya O, Rayet B, Tan NS, Michalik L, Delaunay F, Wahli W &

Laudet V. (2006). Reciprocal regulation of BMAL1 and PPAR α defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol. Endocrinol. in press.*

Canguilhem B, Schmitt P, Mack G & Kempf E. (1977). Feeding behavior, circannual body weight and hibernation rhythms in European hamsters lesioned in the noradrenergic ascending bundles. *Physiol. Behav.* 18, 1067-74.

Canguilhem B, Masson-Pevet M, Koehl C, Pevet P & Bentz I. (1988a). Non-gonadal mediated effect of photoperiod on hibernation and body weight cycles of the European hamster. *Comp. Biochem. Physiol.* 89, 575-8.

Canguilhem B, Vaultier JP, Pevet P, Coumaros G, Masson-Pevet M & Bentz I (1988b). Photoperiodic regulation of body mass, food intake, hibernation, and reproduction in intact and castrated male European hamsters, *Cricetus cricetus*. *J. Comp. Physiol.* 163, 549-57.

Card JP, Fitzpatrick-McElligott S, Gozes I & Baldino F Jr. (1988). Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 252, 307-15.

Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ & Sassone-Corsi P. (2005). Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 309, 1390-4.

Carlberg C & Wiesenberg I. (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J. Pineal Res.* 18, 171-8.

Carr AJ, Johnston JD, Semikhodskii AG, Nolan T, Cagampang FR, Stirling JA & Loudon AS. (2003). Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr. Biol.* 13, 1543-8.

Carr AJ & Whitmore D. (2005). Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat. Cell. Biol.* 7, 319-21.

Cassone VM. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 13, 457-64.

Cassone VM, Chesworth MJ & Armstrong SM. (1986a). Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* 36, 1111-21.

- Cassone VM, Chesworth MJ & Armstrong SM. (1986b). Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J. Biol. Rhythms* 1, 219-29.
- Cassone VM, Roberts MH & Moore RY. (1987). Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci. Lett.* 81, 29-34.
- Cassone VM, Roberts MH & Moore RY. (1988). Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-14C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Am. J. Physiol.* 255, R332-7.
- Castel M, Feinstein N, Cohen S & Harari N. (1990). Vasopressinergic innervation of the mouse suprachiasmatic nucleus: an immuno-electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 298, 172-87.
- Cegielska A, Gietzen KF, Rivers A & Virshup DM. (1998). Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 273, 1357-64.
- Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A & Sassone-Corsi P. (2001). Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J.* 20, 3967-74.
- Chabot V, Gauthier C, Combarrous Y & Taragnat C. (2001). Stimulating effect of glycoprotein hormone free alpha-subunit and daily gonadotropin releasing hormone treatment on prolactin release from 50-day ovine foetal pituitary explants. *J. Neuroendocrinol.* 13, 199-208.
- Challet E, Pitrosky B, Sicard B, Malan A & Pevet P. (2002). Circadian organization in a diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910: chronotypes, responses to constant lighting conditions, and photoperiodic changes. *J. Biol. Rhythms* 17, 52-64.
- Chauvet C, Bois-Joyeux B, Berra E, Pouyssegur J & Danan JL. (2004). The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* 384, 79-85.
- Chen Y, Hunter-Ensor M, Schotland P & Sehgal A. (1998). Alterations of per RNA in noncoding regions affect periodicity of circadian behavioral rhythms. *J. Biol. Rhythms* 13, 364-79.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM & Zhou QY. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405-10.
- Cheng MY, Bittman EL, Hattar S & Zhou QY. (2005). Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci.* 6, 17.
- Cheung P, Allis CD & Sassone-Corsi P. (2000a). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-71.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM & Allis CD. (2000b). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell.* 5, 905-15.
- Chiba Y, Johnson MA, Lidder P, Vogel JT, van Erp H & Green PJ. (2004). AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene* 328, 95-102.
- Chilov D, Hofer T, Bauer C, Wenger RH & Gassmann M. (2001). Hypoxia affects expression of circadian genes *PER1* and *CLOCK* in mouse brain. *FASEB J.* 15, 2613-22.
- Chu YS, Shieh KR, Yuan ZF & Pan JT. (2000). Stimulatory and entraining effect of melatonin on tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and inhibition on prolactin secretion. *J. Pineal Res.* 28, 219-26.
- Claridge-Chang A, Wijnen H, Naef F, Boothroyd C, Rajewsky N & Young MW. (2001). Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32, 657-71.
- Cobb MH, Robbins DJ & Boulton TG. (1991). ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 1025-32.
- Colwell CS, Ralph MR & Menaker M. (1990). Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Res.* 523, 117-20.
- Coogan AN & Piggins HD. (2003). Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J. Neurosci.* 23, 3085-93.
- Cook T & Urrutia R. (2000). TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, 513-21.
- Copeland PR & Wormington M. (2001). The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7, 875-86.

Coste H & Rodriguez JC. (2002). Orphan nuclear hormone receptor Rev-erb α regulates the human apolipoprotein CIII promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 27120-9.

Couttet P, Fromont-Racine M, Steel D, Pictet R & Grange T. (1997). Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5628-33.

Cowell IG, Skinner A & Hurst HC. (1992). Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3070-7.

Crosio C, Cermakian N, Allis CD & Sassone-Corsi P. (2000). Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat. Neurosci.* 3, 1241-7.

Cui LN & Dyball RE. (1996). Synaptic input from the retina to the suprachiasmatic nucleus changes with the light-dark cycle in the Syrian hamster. *J. Physiol.* 497, 483-93.

Cullen BR. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell.* 16, 861-5.

Curtis AM, Seo SB, Westgate EJ, Rudic RD, Smyth EM, Chakravarti D, FitzGerald GA & McNamara P. (2004). Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock. *J. Biol. Chem.* 279, 7091-7.

Cutler DJ, Haraura M, Reed HE, Shen S, Sheward WJ, Morrison CF, Marston HM, Harmar AJ & Piggins HD. (2003). The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 17, 197-204.

D

Daan S & Pittendrigh CS. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curve. *J. Comp. Physiol.* 106, 253-66.

Daan S, Albrecht U, van der Horst GT, Illnerova H, Roenneberg T, Wehr TA & Schwartz WJ. (2001). Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? *J. Biol. Rhythms* 16, 105-16.

Daan S, Mellow M & Roenneberg T. (2002). External time--internal time. *J. Biol. Rhythms* 17, 107-9.

Dardente H, Klosen P, Caldelas I, Pevet P & Masson-Pevet M. (2002a). Phenotype of Per1- and Per2-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent (*Arvicanthis ansorgei*): comparison with a nocturnal species, the rat. *Cell Tissue Res.* 310, 85-92.

Dardente H, Poirel VJ, Klosen P, Pevet P & Masson-Pevet M. (2002b). Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res.* 958, 261-71.

Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosen P, Pevet P & Masson-Pevet M. (2003a). Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 114, 101-6.

Dardente H, Klosen P, Pevet P & Masson-Pevet M. (2003b). MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* 15, 778-86.

Dark J, Pickard GE & Zucker I. (1985). Persistence of circannual rhythms in ground squirrels with lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 332, 201-7.

Dark J, Kilduff TS, Heller HC, Licht P & Zucker I. (1990). Suprachiasmatic nuclei influence hibernation rhythms of golden-mantled ground squirrels. *Brain Res.* 509, 111-8.

Davies IR & Mason R. (1994). Tau-mutant hamster SCN clock neurones express a 20 h firing rate rhythm in vitro. *Neuroreport* 5, 2165-8.

Davis DE & Finnie EP. (1975). Entrainment of circannual rhythm in weight of woodchucks. *J. Mammal.* 56, 199-203.

Davis DE & Swade RH. (1983). Circannual rhythm of torpor and molt in the ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 76, 183-7.

De Cesare D & Sassone-Corsi P. (2000). Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 343-69.

de la Iglesia HO, Meyer J, Carpino A Jr & Schwartz WJ. (2000). Antiphase oscillation of the

left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* 290, 799-801.

de la Iglesia HO, Meyer J & Schwartz WJ. (2004). Using Per gene expression to search for photoperiodic oscillators in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 127, 121-7.

Decoursey PJ. (1960). Phase control of activity in a rodent. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25, 49-55.

Desterro JM, Rodriguez MS & Hay RT. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell.* 2, 233-9.

Desvergne B & Wahli W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649-88.

Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA & Gillette MU. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713-7.

Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR & Gillette MU. (1997). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J. Neurosci.* 17, 667-75.

Ding JM, Buchanan GF, Tischkau SA, Chen D, Kuriashkina L, Faiman LE, Alster JM, McPherson PS, Campbell KP & Gillette MU. (1998). A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 394, 381-4.

Dogterom J, Van Wimersma Greidanus TB & Swabb DF. (1977). Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 24, 108-18.

Dong X, Yagita K, Zhang J & Okamura H. (2005). Expression of ubiquitin-related enzymes in the suprachiasmatic nucleus with special reference to ubiquitin carboxy-terminal hydrolase UchL1. *Biomed. Res.* 26, 43-9.

Dreyfus M & Regnier P. (2002). The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111, 611-3.

Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S & Masana MI. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated

phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.* 12, 1211-20.

Duffield GE. (2003). DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J. Neuroendocrinol.* 15, 991-1002.

Duffield GE, Best JD, Meurers BH, Bittner A, Loros JJ & Dunlap JC. (2002). Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr. Biol.* 12, 551-7.

Duncan MJ. (1998). Photoperiodic regulation of hypothalamic neuropeptide messenger RNA expression: effect of pinealectomy and neuroanatomical location. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 142-8.

Duncan MJ & Davis FC. (1993). Developmental appearance and age related changes in specific 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian hamsters. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 73, 205-12.

Duncan MJ & Goldman BD. (1984a). Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. I. Role of the gonads and pituitary. *J. Exp. Zool.* 230, 89-95.

Duncan MJ & Goldman BD. (1984b). Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. II. Role of prolactin. *J. Exp. Zool.* 230, 97-103.

Duncan MJ, Goldman BD, Di Pinto MN & Stetson MH. (1985). Testicular function and pelage color have different critical daylengths in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Endocrinology* 116, 424-30.

Duncan MJ, Cheng X & Heller KS. (1995). Photoperiodic exposure and time of day modulate the expression of arginine vasopressin mRNA and vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nuclei of Siberian hamsters. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 32, 181-6.

E

Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6133-7.

Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, Watanabe T, Sekimoto M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Ozeki Y, Sugishita M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Nagase T, Ozaki N, Ohara O, Ishida N, Okawa M, Takahashi K & Yamauchi T. (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep.* 2, 342-6.

Eide EJ & Virshup DM. (2001). Casein kinase I: another cog in the circadian clockworks. *Chronobiol. Int.* 18, 389-98.

Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA & Virshup DM. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J. Biol. Chem.* 277, 17248-54.

Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, Vielhaber EL, Giovanni A & Virshup DM. (2005). Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2795-807.

Eldar-Finkelman H, Seger R, Vandenheede JR & Krebs EG. (1995). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 987-90.

Elliott JA. (1976). Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. *Fed. Proc.* 35, 2339-46.

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L & Fujii-Kuriyama Y. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18, 1905-14.

Etchegaray JP, Lee C, Wade PA & Reppert SM. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421, 177-82.

F

Fang M, Jaffrey SR, Sawa A, Ye K, Luo X & Snyder SH. (2000). Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron* 28, 183-93.

Field MD, Maywood ES, O'Brien JA, Weaver DR, Reppert SM & Hastings MH. (2000). Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* 25, 437-47.

Fiol CJ, Mahrenholz AM, Wang Y, Roeske RW & Roach PJ. (1987). Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J. Biol. Chem.* 262, 14042-8.

Fiore P & Gannon RL. (2003). Expression of the transcriptional coactivators CBP and p300 in the hamster suprachiasmatic nucleus: possible molecular components of the mammalian circadian clock. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 111, 1-7.

Flotow H & Roach PJ. (1991). Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J. Biol. Chem.* 266, 3724-7.

Follett BK & Potts C. (1990). Hypothyroidism affects reproductive refractoriness and the seasonal oestrous period in Welsh Mountain ewes. *J. Endocrinol.* 127, 103-9.

Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliewer SA, Henshaw R, Ong ES & Evans RM. (1994). Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 8, 1253-61.

Foster RG & Hankins MW. (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog. Retin Eye Res.* 21, 507-27.

Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, De Grip W & Menaker M. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J. Comp. Physiol.* 169, 39-50.

Frame S & Cohen P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359, 1-16.

Freeman DA & Zucker I. (2001). Refractoriness to melatonin occurs independently at multiple brain sites in Siberian hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6447-52.

Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P & Lee C. (2002). The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 111, 41-50.

Fukuhara C, Suzuki N, Matsumoto Y, Nakayama Y, Aoki K, Tsujimoto G, Inouye SI & Masuo Y. (1997). Day-night variation of pituitary adenylate

cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 229, 49-52.

G

Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pevet P & Simonneaux V. (2001). In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience* 105, 721-9.

Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW & Schutz G. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34, 245-53.

Gauer F, Masson-Pevet M & Pevet P. (1992). Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Res.* 575, 32-38.

Gauer F, Masson-Pevet M & Pevet P. (1993a). Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* 602, 153-156.

Gauer F, Masson-Pevet M, Skene DJ, Vivien-Roels B & Pevet P. (1993b). Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 57, 120-126.

Gauer F, Masson-Pevet M, Stehle J & Pevet P. (1994a). Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.* 641, 92-98.

Gauer F, Masson-Pevet M & Pevet P. (1994b). Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 96, 187-195.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS & Weitz CJ. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-9.

Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V & Staels B. (1999). Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome

proliferator-activated receptor response element. *Mol. Endocrinol.* 13, 400-9.

Ghiasvand M, Heshmat R, Golpira R, Haghpanah V, Soleimani A, Shoushtarizadeh P, Tavangar SM & Larijani B. (2006). Shift working and risk of lipid disorders: A cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* 5, 9-18 *in press*.

Gibbons GF, Patel D, Wiggins D & Knight BL. (2002). The functional efficiency of lipogenic and cholesterologenic gene expression in normal mice and in mice lacking the peroxisomal proliferator-activated receptor- α (PPAR- α). *Adv. Enzyme Regul.* 42, 227-47.

Gietzen KF & Virshup DM. (1999). Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J. Biol. Chem.* 274, 32063-70.

Gill G. (2003). Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 108-13.

Gill G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* 18, 2046-59.

Gillette MU & McArthur AJ. (1996). Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Brain Res.* 73, 135-9.

Gillette MU & Mitchell JW. (2002). Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309, 99-107.

Gillette MU & Reppert SM. (1987). The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res. Bull.* 19, 135-9.

Gillette MU, Medanic M, McArthur AJ, Liu C, Ding JM, Faiman LE, Weber ET, Tchong TK & Gallman EA. (1995). Intrinsic neuronal rhythms in the suprachiasmatic nuclei and their adjustment. *Ciba. Found. Symp.* 183, 134-44.

Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS & Greenberg ME. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260, 238-41.

Golombek DA & Ralph MR. (1994). KN-62, an inhibitor of Ca²⁺/calmodulin kinase II, attenuates circadian responses to light. *Neuroreport.* 5, 1638-40.

Gonzalez GA & Montminy MR. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-80.

Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W 3rd, Vale WW & Montminy MR. (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337, 749-52.

Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE & Saper CB. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 4, 1165.

Graves PR & Roach PJ. (1995). Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J. Biol. Chem.* 270, 21689-94.

Green CB & Besharse JC. (1996). Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14884-8.

Green DJ & Gillette R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245, 198-200.

Gribkoff VK, Pieschl RL, Wisialowski TA, van den Pol AN & Yocca FD. (1998). Phase shifting of circadian rhythms and depression of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus by neuropeptide Y: mediation by different receptor subtypes. *J. Neurosci.* 18, 3014-22.

Griffin EA Jr, Staknis D & Weitz CJ. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286, 768-71.

Groos GA & Mason R. (1978). Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurons at different adaptation levels. *Neurosci. letters* 8, 59-64.

Gross DS. (1983). Hormone production in the hypophysial pars tuberalis of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 112, 733-744.

Gross DS, Turgeon JL & Waring DW. (1984). The ovine pars tuberalis : a naturally occurring source of partially purified gonadotropes which secrete LH in vitro. *Endocrinology* 114, 2084-91.

Gross SD & Anderson RA. (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* 10, 699-711.

Grosse J, Velickovic A & Davis FC. (1996). Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *Am. J. Physiol.* 270, 533-40.

Grundschober C, Delaunay F, Puhlhofer A, Triqueneaux G, Laudet V, Bartfai T & Nef P. (2001). Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 46751-8.

Guerra M & Rodriguez EM. (2001). Identification, cellular and subcellular distribution of 21 and 72 kDa proteins (tuberalins?) secreted by specific cells of the pars tuberalis. *J. Endocrinol.* 168, 363-379.

Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pevet P & Masson-Pevet M. (2000). Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 71, 163-169.

Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RB & Bittman EL. (2005). Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3111-6.

H

Hahm SH & Eiden LE. (1998). Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene. *J. Biol. Chem.* 273, 17086-94.

Hamada T, LeSauter J, Venuti JM & Silver R. (2001). Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J. Neurosci.* 21, 7742-50.

Hamada T, LeSauter J, Lokshin M, Romero MT, Yan L, Venuti JM & Silver R. (2003). Calbindin influences response to photic input in suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 23, 8820-6.

Hamada T, Antle MC & Silver R. (2004). Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1741-8.

Hannibal J. (2002). Neurotransmitters of the retinohypothalamic tract. *Cell. Tissue Res.* 309, 73-88.

Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B & Fahrenkrug J. (2002). The photopigment

melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J. Neurosci.* 22, 191.

Hao H & Schwaber J. (2006). Epidermal growth factor receptor induced Erk phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1088, 45-8.

Hao H, Allen DL & Hardin PE. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3687-93.

Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T & Fukada Y. (2005). Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* 280, 31714-21.

Hardin PE. (2004). Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J. Biol. Rhythms* 19, 348-60.

Harding HP & Lazar MA. (1995). The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4791-802.

Harley CW, Farrell RC & Rusak B. (2001). Daily variation in the distribution of glycogen phosphorylase in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters. *J. Comp. Neurol.* 435, 249-58.

Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, Sheward WJ, Morrison CF, Dorin JR, Piggins HD, Reubi JC, Kelly JS, Maywood ES & Hastings MH. (2002). The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497-508.

Harrington ME & Rusak B. (1986). Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms.* 1, 309-25.

Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R & Polakis P. (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* 9, 207-10.

Hastings MH. (2005). Circadian biology: fibroblast clocks keep ticking. *Curr. Biol.* 15, 16-8.

Hastings MH & Herzog ED. (2004). Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Rhythms.* 19, 400-13.

Hastings MH, Walker AP & Herbert J. (1987). Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on pineal melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J. Endocrinol.* 114, 221-9.

Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES & Grosse J. (1992). Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res.* 591, 20-6.

Hastings MH, Field MD, Maywood ES, Weaver DR & Reppert SM. (1999). Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J. Neurosci.* 19, RC11.

Hastings MH, Reddy AB & Maywood ES. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 649-61.

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM & Yau KW. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-70.

Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG & Yau KW. (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76-81.

Hazlerigg DG & Wagner GC. (2006). Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 83-91.

Hazlerigg DG, Hastings MH & Morgan PJ. (1996). Production of a prolactin releasing factor by the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* 8, 489-492.

Hazlerigg DG, Morgan PJ & Messenger S. (2001). Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? *J. Biol. Rhythms* 16, 326-35.

Hazlerigg DG, Andersson H, Johnston JD & Lincoln G. (2004). Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Curr. Biol.* 14, 334-9.

Hazlerigg DG, Ebling FJ & Johnston JD. (2005). Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr. Biol.* 15, 449-50.

- Hertz R, Bishara-Shieban J & Bar-Tana J. (1995). Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J. Biol. Chem.* 270, 13470-5.
- Herwig A, Revel F, Saboureau M, Pevet P & Steinlechner S. (2006). Daily torpor alters multiple gene expression in the suprachiasmatic nucleus and pineal gland of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Chronobiol. Int.* 23, 269-76.
- Herzog ED, Geusz ME, Khalsa SB, Straume M & Block GD. (1997). Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multimicroelectrode plates. *Brain Res.* 757, 285-90.
- Herzog ED, Takahashi JS & Block GD. (1998). Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 708-13.
- Herzog ED, Grace MS, Harrer C, Williamson J, Shinohara K & Block GD. (2000). The role of Clock in the developmental expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 424, 86-98.
- Hida A, Koike N, Hirose M, Hattori M, Sakaki Y & Tei H. (2000). The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. *Genomics* 65, 224-33.
- Hirayama J & Sassone-Corsi P. (2005). Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 548-56.
- Hirota T & Fukada Y. (2004). Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog. Sci.* 21, 359-68.
- Hirota T, Okano T, Kokame K, Shirotani-Ikejima H, Miyata T & Fukada Y. (2002). Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277, 44244-51.
- Hochstetler KJ, Garland T Jr, Swallow JG, Carter PA & Bult-Itto A. (2004). Number of arginine-vasopressin neurons in the suprachiasmatic nuclei is not related to level or circadian characteristics of wheel-running activity in house mice. *Behav. Genet.* 34, 131-6.
- Hoffmann K. (1979). Photoperiodic effects in the Djungarian hamster: one minute of light during darktime mimics influence of long photoperiods on testicular recrudescence, body weight and pelage colour. *Experientia.* 35, 1529-30.
- Hoffmann K & Illnerova H. (1986). Photoperiodic effects in the Djungarian hamster. Rate of testicular regression and extension of pineal melatonin pattern depend on the way of change from long to short photoperiods. *Neuroendocrinology* 43, 317-21.
- Hofman MA, Zhou JN & Swaab DF. (1996). No evidence for a diurnal vasoactive intestinal polypeptide (VIP) rhythm in the human suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 722, 78-82.
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH & Bradfield CA. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 8581-93.
- Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S & Bradfield CA. (1998). The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5474-9.
- Honkanen RE & Golden T. (2002). Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr. Med. Chem.* 9, 2055-75.
- Honma S, Katsuno Y, Shinohara K, Abe H & Honma K. (1996a). Circadian rhythm and response to light of extracellular glutamate and aspartate in rat suprachiasmatic nucleus. *Am. J. Physiol.* 271, 579-85.
- Honma S, Kanematsu N, Katsuno Y & Honma K. (1996b). Persistence of circadian oscillation while locomotor activity and plasma melatonin levels became aperiodic under prolonged continuous light in the rat. *Neurosci. Lett.* 216, 49-52.
- Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M & Honma K. (1998a). Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci. Lett.* 250, 157-60.
- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K & Nomura M. (1998b). Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 83-7.
- Honma S, Shirakawa T, Nakamura W & Honma K. (2000). Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neurosci. Lett.* 294, 113-6.
- Hosoda H, Motohashi J, Kato H, Masushige S & Kida S. (2004). A BMAL1 mutant with arginine 91

substituted with alanine acts as a dominant negative inhibitor. *Gene* 338, 235-41.

Hsu MH, Palmer CN, Song W, Griffin KJ & Johnson EF. (1998). A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J. Biol. Chem.* 273, 27988-97.

Humlova M & Illnerova H. (1990). Melatonin entrains the circadian rhythm in the rat pineal N-acetyltransferase activity. *Neuroendocrinology* 52, 196-9.

Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU & Dubocovich ML. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, 110-8.

Hut R. (2006). Dawn and dusk in entrainment of the circadian timing system. S. F. C. Congress. Lyon, France May 9-11.

I

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

Ikeda M & Allen CN. (2003). Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1111-8.

Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C & Storm DR. (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16, 973-82.

Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G & Storm DR. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21, 869-83.

Ingram CD, Ciobanu R, Coculescu IL, Tanasescu R, Coculescu M & Mihai R. (1998). Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Brain Res.* 119, 351-64.

Inoue I, Shinoda Y, Ikeda M, Hayashi K, Kanazawa K, Nomura M, Matsunaga T, Xu H, Kawai S, Awata T, Komoda T & Katayama S. (2005). CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *J. Atheroscler. Thromb.* 12, 169-74.

Inouye ST & Kawamura H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5962-6.

Ishida Y, Yagita K, Fukuyama T, Nishimura M, Nagano M, Shigeyoshi Y, Yamaguchi S, Komori T & Okamura H. (2001). Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iepsilon and Idelta mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Res.* 64, 612-6.

Isoe Y & Nishino H. (1998). AVP rhythm in the suprachiasmatic nucleus in relation to locomotor activity under constant light. *Peptides* 19, 827-32.

Iwahana E, Akiyama M, Miyakawa K, Uchida A, Kasahara J, Fukunaga K, Hamada T & Shibata S. (2004). Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2281-7.

Iwasaki Y, Oiso Y, Saito H & Majzoub JA. (1997). Positive and negative regulation of the rat vasopressin gene promoter. *Endocrinology* 138, 5266-74.

Izumo M, Johnson CH & Yamazaki S. (2003). Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting: temperature compensation and damping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 16089-94.

J

Jac M, Kiss A, Sumova A, Illnerova H & Jezova D. (2000). Daily profiles of arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic, supraoptic and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus under various photoperiods. *Brain Res.* 887, 472-6.

Jacob N, Vuillez P, Pevet P. (1997). Photoperiod does not act on the suprachiasmatic nucleus photosensitive phase through the endogenous melatonin, in the Syrian hamster. *Neurosci. Lett.* 229, 117-20.

K

Jagota A, de la Iglesia HO & Schwartz WJ. (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat. Neurosci.* 3, 372-6.

Jiang ZG, Yang Y, Liu ZP & Allen CN. (1997). Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J. Physiol.* 499, 141-59.

Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ & Reppert SM. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68.

Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM & Weaver DR. (2003). Targeted disruption of the mouse *Mel(1b)* melatonin receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1054-60.

Jobst EE & Allen CN. (2002). Calbindin neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus do not exhibit a circadian variation in spontaneous firing rate. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2469-74.

Jobst EE, Robinson DW & Allen CN. (2004). Potential pathways for intercellular communication within the calbindin subnucleus of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 123, 87-99.

Johnson RF, Moore RY & Morin LP. (1988a). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 460, 297-313.

Johnson RF, Morin LP & Moore RY. (1988b). Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462, 301-12.

Johnston JD, Cagampang FR, Stirling JA, Carr AJ, White MR, Davis JR & Loudon AS. (2003). Evidence for an endogenous *per1*- and *ICER*-independent seasonal timer in the hamster pituitary gland. *FASEB J.* 17, 810-5.

Johnston JD, Ebling FJ & Hazlerigg DG. (2005). Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur. J. Neurosci.* 21, 2967-74.

Jones JT, Akita RW & Sliwkowski MX. (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* 447, 227-31.

Kalsbeek A & Buijs RM. (1996). Rhythms of inhibitory and excitatory output from the circadian timing system as revealed by in vivo microdialysis. *Prog. Brain Res.* 111, 273-93.

Kalsbeek A, Buijs RM, van Heerikhuizen JJ, Arts M & van der Woude TP. (1992). Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res.* 580, 62-7.

Kalsbeek A, Teclemariam-Mesbah R & Pevet P. (1993). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Neurol.* 332, 293-314.

Kalsbeek A, van der Vliet J & Buijs RM. (1996). Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J. Neuroendocrinol.* 8, 299-307.

Kalsbeek A, Cutrera RA, Van Heerikhuizen JJ, Van Der Vliet J & Buijs RM. (1999). GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 91, 453-61.

Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P & Buijs RM. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3146-54.

Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Enderit E & Buijs RM. (2001). The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142, 2677-85.

Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJ & Brown MB. (1989). Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol. Reprod.* 41, 1034-46.

Kassam A, Capone JP & Rachubinski RA. (1999). Orphan nuclear hormone receptor RevErb α modulates expression from the promoter of the hydratase-dehydrogenase gene by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent transactivation. *J. Biol. Chem.* 274, 22895-900.

- Keesler GA, Camacho F, Guo Y, Virshup D, Mondadori C & Yao Z. (2000). Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport* 11, 951-5.
- Kellendonk C, Opherk C, Anlag K, Schutz G & Tronche F. (2000). Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* 26, 151-3.
- Kim YI & Dudek FE. (1993). Membrane properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons receiving optic nerve input. *J. Physiol.* 464, 229-43.
- Kim do Y, Choi HJ, Kim JS, Kim YS, Jeong do U, Shin HC, Kim MJ, Han HC, Hong SK & Kim YI. (2005). Voltage-gated calcium channels play crucial roles in the glutamate-induced phase shifts of the rat suprachiasmatic circadian clock. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1215-22.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW & Takahashi JS. (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-653.
- Kirsch R, Belnaoui S, Gormelen S & Pevet P. (1993). Daily melatonin infusion entrains free-running activity in Syrian and Siberian hamsters. In: Wetterberg L, editor. *Light and biological rhythms in man*. Oxford: Pergamon 107-20.
- Kita Y, Shiozawa M, Jin W, Majewski RR, Besharse JC, Greene AS & Jacob HJ. (2002). Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics* 12, 55-65.
- Klein DC, & Moore RY. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174, 245-62.
- Klerman EB, Shanahan TL, Brotman DJ, Rimmer DW, Emens JS, Rizzo JF 3rd & Czeisler CA. (2002). Photic resetting of the human circadian pacemaker in the absence of conscious vision. *J. Biol. Rhythms* 17, 548-55.
- Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K & Evans RM. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7355-9.
- Klosen P, Bienvenu C, Demarteau O, Dardente H, Guerrero H, Pevet P & Masson-Pevet M. (2002). The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1647-57.
- Kojima S, Hirose M, Tokunaga K, Sakaki Y & Tei H. (2003). Structural and functional analysis of 3' untranslated region of mouse *Period1* mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1-7.
- Kojima S, matsumoto K, Shimada M, Nagano M, Shigeyoshi Y, Hoshino S, Green CB, Sakaki Y & Tei H. (2006). Lark activates post-transcriptional expression of a mammalian clock protein, *period1*. Society for Research on Biological Rhythms Congress, Sandestin, Florida, USA. May 21-25.
- Kondo N, Sekijima T, Kondo J, Takamatsu N, Tohya K & Ohtsu T. (2006). Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* 125, 161-72.
- Kondratov RV, Chernov MV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov AV & Antoch MP. (2003). BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev.* 17, 1921-32.
- Kondratov RV, Shamanna RK, Kondratova AA, Gorbacheva VY & Antoch MP. (2006). Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation. *FASEB J.* 20, 530-2.
- Kornberg RD. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-71.
- Korner CG & Wahle E. (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448-56.
- Koshibu K & Levitt P. (2005). Sex differences in expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor mRNA in Waved-1 and C57Bl6 mice. *Neuroscience* 134, 877-87.
- Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC & Weitz CJ. (2001). Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294, 2511-5.
- Kruisbrink J, Mirmiran M, Van der Woude TP & Boer GJ. (1987). Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat. *Brain Res.* 419, 76-86.

Kuhlman SJ, Quintero JE & McMahon DG. (2000). GFP fluorescence reports Period 1 circadian gene regulation in the mammalian biological clock. *Neuroreport* 11, 1479-82.

Kuhlmann MT, Clemen G & Schlatt S. (2003). Molting in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus* Pallas): seasonal or continuous process? *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 295, 160-71.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH & Reppert SM. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR & Goodman RH. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-6.

L

Lachner M & Jenuwein T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 286-98.

Lafarque M, Oliveros L & Aguado L. (1998). Effect of adenohipophyseal pars tuberalis secretions on pars distalis prolactin liberation. *Medicina (B. Aires)* 58, 36-40.

Lambert CM, Machida KK, Smale L, Nunez AA & Weaver DR. (2005). Analysis of the prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J. Biol. Rhythms* 20, 206-18.

Lamprecht C & Mueller CR. (1999). D-site binding protein transactivation requires the proline- and acid-rich domain and involves the coactivator p300. *J. Biol. Chem.* 274, 17643-8.

Larsen PJ, Vrang N, Moller M, Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS & Mikkelsen JD. (1994). The diurnal expression of genes encoding vasopressin and vasoactive intestinal peptide within the rat suprachiasmatic nucleus is influenced by circulating glucocorticoids. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27, 342-6.

Larsen PJ. (1999). Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc. Res. Tech.* 46, 296-304.

Lavialle M & Serviere J. (1993). Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 4, 1243-6.

Leak RK & Moore RY. (2001). Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J. Comp. Neurol.* 433, 312-34.

Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS & Reppert SM. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867.

Lee C, Weaver DR & Reppert SM. (2004). Direct association between mouse PERIOD and CKIepsilon is critical for a functioning circadian clock. *Mol. Cell. Biol.* 24, 584-94.

Lee JM, Schak KM & Harrington ME. (1999). Inhibition of protein kinase A phase delays the mammalian circadian clock. *Brain Res.* 835, 350-3.

Lee JS, Zhang X & Shi Y. (1996). Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A. *J. Biol. Chem.* 271, 17666-74.

Lee TM & Zucker I. (1991). Suprachiasmatic nucleus and photic entrainment of circannual rhythms in ground squirrels. *J. Biol. Rhythms* 6, 315-30.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S & Kim VN. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-9.

Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J & Wahli W. (1994). Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 269, 24527-30.

Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimakopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W & Auwerx J. (1996). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J. Biol. Chem.* 271, 1764-9.

LeSauter J & Silver R. (1999). Localization of a suprachiasmatic nucleus subregion regulating locomotor rhythmicity. *J. Neurosci.* 19 5574-85.

Li X, Sankrithi N & Davis FC. (2002). Transforming growth factor-alpha is expressed in astrocytes of the suprachiasmatic nucleus in hamster: role of glial cells in circadian clocks. *Neuroreport* 13, 2143-7.

- Liang FQ, Walline R & Earnest DJ. (1998). Circadian rhythm of brain-derived neurotrophic factor in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 242, 89-92.
- Liang FQ, Allen G & Earnest D. (2000). Role of brain-derived neurotrophic factor in the circadian regulation of the suprachiasmatic pacemaker by light. *J. Neurosci.* 20, 2978-87.
- Lidder P, Gutierrez RA, Salome PA, McClung CR & Green PJ. (2005). Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiol.* 138, 2374-85.
- Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SM, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJ, Carvalho CR, Cipolla-Neto J. (1988). Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am. J. Physiol.* 275, 934-41.
- Lincoln GA. (1994). Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. *J. Endocrinol.* 142, 267-276.
- Lincoln GA & Clarke IJ. (1994). Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J. Neuroendocrinol.* 6, 251-60.
- Lincoln GA & Clarke IJ. (1995). Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a dopamine-independent mechanism to mediate effects of daylength on the secretion of prolactin in the ram. *J. Neuroendocrinol.* 7, 637-643.
- Lincoln GA & Clarke IJ. (2000). Role of the pituitary gland in the development of photorefractoriness and generation of long-term changes in prolactin secretion in rams. *Biol. Reprod.* 62, 432-8.
- Lincoln GA & Clarke IJ. (2002). Noradrenaline and dopamine regulation of prolactin secretion in sheep: role in prolactin homeostasis but not photoperiodism. *J. Neuroendocrinol.* 14, 36-44.
- Lincoln GA & Ebling FJ. (1985). Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. *J. Reprod. Fertil.* 73, 241-53.
- Lincoln GA & Richardson M. (1998). Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 283-94.
- Lincoln GA, Clarke IJ & Sweeney T. (1996). 'Hamster-like' cycles in testicular size in the absence of gonadotrophin secretion in HPD rams exposed to long-term changes in photoperiod and treatment with melatonin. *J. Neuroendocrinol.* 8, 855-66.
- Lincoln G, Messenger S, Andersson H & Hazlerigg D. (2002). Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: Evidence for an internal coincidence timer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13890-13895.
- Lincoln GA, Andersson H & Loudon A. (2003a). Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals—a unifying hypothesis. *J. Endocrinol.* 179, 1-13.
- Lincoln GA, Andersson H & Clarke IJ. (2003b). Prolactin cycles in sheep under constant photoperiod: evidence that photorefractoriness develops within the pituitary gland independently of the prolactin output signal. *Biol. Reprod.* 69, 1416-23.
- Lincoln GA, Andersson H & Hazlerigg D. (2003c). Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* 15, 390-7.
- Lincoln GA, Johnston JD, Andersson H, Wagner G & Hazlerigg DG. (2005). Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology* 146, 3782-90.
- Liou SY, Shibata S, Iwasaki K & Ueki S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16, 527-31.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK & Reppert SM. (1997a). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91-102.
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH & Reppert SM. (1997b). Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91, 855-60.

Liu F, Virshup DM, Nairn AC & Greengard P. (2002). Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 45393-9.

Liu X & Green CB. (2001). A novel promoter element, photoreceptor conserved element II, directs photoreceptor-specific expression of nocturnin in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 276, 15146-54.

Liu X & Green CB. (2002). Circadian regulation of nocturnin transcription by phosphorylated CREB in *Xenopus* retinal photoreceptor cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7501-11.

Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R & Berger SL. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell.* 5, 917-26.

Long MA, Jutras MJ, Connors BW & Burwell RD. (2005). Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.* 8, 61-6.

Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M & Schibler U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* 16, 6762-71

Loudon AS, Ihara N & Menaker M. (1998). Effects of a circadian mutation on seasonality in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Proc. Biol. Sci.* 265, 517-21.

Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M & Takahashi JS. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288, 483-492.

Lowrey PL & Takahashi JS. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5, 407-41.

Low-Zeddies SS & Takahashi JS. (2001). Chimera analysis of the Clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell* 105, 25-42.

Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P & Saper CB. (2001). Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J. Neurosci.* 21, 4864-74.

Lucas RJ, Freedman MS, Munoz M, Garcia-Fernandez JM & Foster RG. (1999). Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 505-7.

Lucas RJ, Douglas RH & Foster RG. (2001). Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat. Neurosci.* 4, 621-6.

Luetkeke NC, Phillips HK, Qiu TH, Copeland NG, Earp HS, Jenkins NA & Lee DC. (1994). The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev.* 8, 399-413.

Lundkvist GB, Kwak Y, Davis EK, Tei H & Block GD. (2005). A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. *J. Neurosci.* 25, 7682-6.

M

Ma YJ, Junier MP, Costa ME & Ojeda SR. (1992). Transforming growth factor-alpha gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron* 9, 657-70.

Ma YJ, Costa ME & Ojeda SR. (1994). Developmental expression of the genes encoding transforming growth factor alpha and its receptor in the hypothalamus of female rhesus macaques. *Neuroendocrinology* 60, 346-59.

Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V & Thiery JC. (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol. Reprod.* 48, 752-760.

Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Locatelli A & Thiery JC. (1994). Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 101, 625-632.

Malpaux B, Skinner DC & Maurice F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J. Neuroendocrinol.* 7, 199-206.

Malpaux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G & Chemineau P. (1998). Evidence that melatonin

acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139, 1508-16.

Malpoux B, Migaud M, Tricoire H & Chemineau P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J. Biol. Rhythms* 16, 336-47.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9.

Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K & Benarous R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* 1, 565-74.

Marquez S, Crespo P, Carlini V, Garbarino-Pico E, Baler R, Caputto BL & Guido ME. (2004). The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1. *FASEB J.* 18, 519-21.

Mason R & Rusak B. (1990). Neurophysiological responses to melatonin in the SCN of short-day sensitive and refractory hamsters. *Brain Res.* 533, 15-9.

Masson-Pevet M & Gauer F. (1994). Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol. Signals* 3, 63-70.

Masson-Pevet M, Naimi F, Canguilhem B, Saboureau M, Bonn D & Pevet P. (1994a). Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J. Pineal Res.* 17, 151-3.

Masson-Pevet M, George D, Kalsbeek A, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N & Pevet P. (1994b). An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res.* 278, 97-106.

Mathur A, Golombek DA, Ralph MR. (1996). cGMP-dependent protein kinase inhibitors block light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Am. J. Physiol.* 270, 1031-6.

Matunis MJ, Wu J & Blobel G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* 140, 499-509.

Maywood ES & Hastings MH. (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 136, 144-53.

Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD & Hastings MH. (1999). Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15211-6.

Maywood ES, O'Brien JA & Hastings MH. (2003). Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* 15, 329-34.

McArthur AJ, Gillette MU & Prosser RA. (1991). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 565, 158-61.

McArthur AJ, Hunt AE & Gillette MU. (1997). Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138, 627-34.

McNamara P, Seo SP, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D & FitzGerald GA. (2001). Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 105, 877-89.

Medanic M & Gillette MU. (1992). Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J. Physiol.* 450, 629-42.

Meijer JH, Groos GA & Rusak B. (1986). Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Res.* 382, 109-18.

Meijer JH, Rusak B & Harrington ME. (1989). Photically responsive neurons in the hypothalamus of a diurnal ground squirrel. *Brain Res.* 501, 315-23.

Meijer JH, Rusak B & Ganshirt G. (1992). The relation between light-induced discharge in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts of hamster circadian rhythms. *Brain Res.* 598, 257-63.

- Meijer JH, Schaap J, Watanabe K & Albus H. (1997). Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Res.* 753, 322-7.
- Meijer JH, Watanabe K, Schaap J, Albus H & Detari L. (1998). Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus: long-term multiunit and single-unit recordings in freely moving rats. *J. Neurosci.* 18, 9078-87.
- Menet JS, Vuillez P & Pevet P. (2003). Calbindin expression in the hamster suprachiasmatic nucleus depends on day-length. *Neuroscience* 122, 591-8.
- Mens WB, Andringa-Bakker EA & Van Wimersma Greidanus TB. (1982). Changes in cerebrospinal fluid levels of vasopressin and oxytocin of the rat during various light-dark regimes. *Neurosci. Lett.* 34, 51-6.
- Messenger S, Ross AW, Barrett P & Morgan PJ. (1999). Decoding photoperiodic time through *Per1* and *ICER* gene amplitude. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9938-43.
- Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG & Morgan PJ. (2000). Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2865-70.
- Messenger S, Garabette ML, Hastings MH & Hazlerigg DG. (2001). Tissue-specific abolition of *Per1* expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12, 579-82.
- Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN & Bittman EL. (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140, 207-18.
- Miki N, Ikuta M & Matsui T. (2004). Hypoxia-induced activation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha4 gene by an interaction between hypoxia-inducible factor-1 and Sp1. *J. Biol. Chem.* 279, 15025-31.
- Mintz EM, Marvel CL, Gillespie CF, Price KM & Albers HE. (1999). Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J. Neurosci.* 19, 5124-30.
- Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y & Okamura H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 15, 995-1006.
- Miyake S, Sumi Y, Yan L, Takekida S, Fukuyama T, Ishida Y, Yamaguchi S, Yagita K & Okamura H. (2000). Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 294, 41-44.
- Miyamoto Y & Sancar A. (1998). Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6097-102.
- Miyamoto Y & Sancar A. (1999). Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71, 238-43.
- Miyazaki K, Mesaki M & Ishida N. (2001). Nuclear entry mechanism of rat *PER2* (*rPER2*): role of *rPER2* in nuclear localization of *CRY* protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6651-9.
- Miyazaki K, Nagase T, Mesaki M, Narukawa J, Ohara O & Ishida N. (2004). Phosphorylation of clock protein *PER1* regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts. *Biochem. J.* 380, 95-103.
- Moga MM & Moore RY. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 389, 508-34.
- Monecke S & Wollnik F. (2004). European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression. *Biol. Reprod.* 70, 1438-43.
- Monecke S & Wollnik F. (2005). Seasonal variations in circadian rhythms coincide with a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster. *J. Comp. Physiol.* 175, 167-83.
- Moore RY & Eichler VB. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201-6.
- Moore RY & Speh JC. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150, 112-6.
- Morgan PJ. (2000). The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *J. Neuroendocrinol.* 12, 287-95.
- Morgan PJ & Mercer JG. (1994). Control of seasonality by melatonin. *Proc. Nutr. Soc.* 53, 483-93.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE & Helliwell R. (1994). Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24, 101-46.

Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, MacLean A & Barrett P. (1996). The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 137, 4018-26.

Morgan PJ, Ross AW, Graham ES, Adam C, Messenger S & Barrett P. (1998). *oPer1* is an early response gene under photoperiodic regulation in the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* 10, 319-23.

Morin LP & Wood RI. (2001). A stereotaxic atlas of the golden hamster brain. Academic Press, San Diego.

Morin A, Denoroy L & Jouvét M. (1991). Daily variations in concentration of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in discrete brain areas of the rat. *Brain Res.* 538, 136-40.

Morin LP, Blanchard J & Moore RY. (1992). Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis. Neurosci.* 8, 219-30.

Morin LP, Blanchard JH & Provencio I. (2003). Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 465, 401-16.

Moriya T, Horikawa K, Akiyama M & Shibata S. (2000). Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters. *Mol. Pharmacol.* 58, 1554-62.

Morse D, Cermakian N, Brancorsini S, Parvinen M & Sassone-Corsi P. (2003). No circadian rhythms in testis: *Period1* expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol. Endocrinol.* 17, 141-51.

Mrosovsky N. (1980). Circannual cycles in golden-mantled ground squirrels : experiments with food deprivation and effects of temperature on periodicity. *J. Comp. Physiol.*, 136, 355-60.

Mrosovsky N. (1990). Circannual cycles in golden-mantled ground squirrels : fall and spring cold pulses. *J. Comp. Physiol.* 167, 683-9.

Mrosovsky N. (1996). Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 71, 343-72.

Mrosovsky N, Boshes M, Hallonquist JD & Lang K. (1971). Disturbance in the annual weight and hibernation cycles of thirteen-lined ground squirrels kept in constant conditions and the effect of temperature changes. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 2, 79-80.

Mrugala M, Zlomanczuk P, Jagota A & Schwartz WJ. (2000). Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R987-94.

Munoz E, Brewer M & Baler R. (2002). Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. *J. Biol. Chem.* 277, 36009-17.

N

Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F & Schibler U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693-705.

Nakahata Y, Okumura N, Shima T, Okada M & Nagai K. (2000). Light-induced tyrosine phosphorylation of BIT in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurochem.* 74, 2436-44.

Nakahata Y, Okumura N, Otani H, Hamada J, Numakawa T, Sano S & Nagai K. (2003). Stimulation of BIT induces a circadian phase shift of locomotor activity in rats. *Brain Res.* 976, 194-201.

Nakahata Y, Akashi M, Trcka D, Yasuda A & Takumi T. (2006). The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol. Biol.* 7, 5-15.

Nakamura W, Honma S, Shirakawa T & Honma K. (2002). Clock mutation lengthens the circadian period without damping rhythms in individual SCN neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 399-400.

Nakaya M, Sanada K & Fukada Y. (2003). Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 494-501.

Naruse Y, Oh-hashii K, Iijima N, Naruse M, Yoshioka H & Tanaka M. (2004). Circadian and light-induced transcription of clock gene *Per1* depends on histone acetylation and deacetylation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6278-87.

Nelson DE & Takahashi JS. (1991). Comparison of visual sensitivity for suppression of pineal melatonin and circadian phase-shifting in the golden hamster. *Brain Res.* 554, 272-7.

Nicholson AW. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371-90.

Nishida E & Gotoh Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci.* 18, 128-31.

Nishii K, Yamanaka I, Yasuda M, Kiyohara YB, Kitayama Y, Kondo T & Yagita K. (2006). Rhythmic post-transcriptional regulation of the circadian clock protein *mPER2* in mammalian cells: a real-time analysis. *Neurosci. Lett.* 401, 44-8.

Nishiyama A, Masutani H, Nakamura H, Nishinaka Y & Yodoi J. (2001). Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life* 52, 29-33.

Nomura K, Takeuchi Y, Yamaguchi S, Okamura H & Fukunaga K. (2003). Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of *mPer1*. *J. Neurosci. Res.* 72, 384-92.

Nuesslein-Hildesheim B, O'Brien JA, Ebling FJ, Maywood ES & Hastings MH. (2000). The circadian cycle of *mPER* clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2856-64.

O

Obrietan K, Impey S & Storm DR. (1998). Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat. Neurosci.* 1, 693-700.

Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J & Storm DR. (1999). Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the

suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Chem.* 274, 17748-56.

Ohta H, Yamazaki S & McMahan DG. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 267-9.

Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T & Ishida N. (1998). Antiphase circadian expression between *BMAL1* and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 199-203.

Oishi K, Fukui H & Ishida N. (2000). Rhythmic expression of *BMAL1* mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 164-71.

Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, Ohkura N, Azama T, Mesaki M, Yukimasa S, Kobayashi H, Iitaka C, Umehara T, Horikoshi M, Kudo T, Shimizu Y, Yano M, Monden M, Machida K, Matsuda J, Horie S, Todo T & Ishida N. (2003). Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals *CLOCK*-regulated circadian output genes. *J. Biol. Chem.* 278, 41519-27.

Oishi K, Shirai H & Ishida N. (2005). *CLOCK* is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (*PPARalpha*) in mice. *Biochem. J.* 386, 575-81.

Okamura H & Ibata Y. (1994). GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neurosci. Lett.* 181, 165-8.

Okamura H, Murakami S, Fukui K, Uda K, Kawamoto K, Kawashima S, Yanaihara N & Ibata Y. (1986). Vasoactive intestinal peptide- and peptide histidine isoleucine amide-like immunoreactivity colocalize with vasopressin-like immunoreactivity in the canine hypothalamo-neurohypophysial neuronal system. *Neurosci. Lett.* 69, 227-32.

Okamura H, Takahashi Y, Terubayashi H, Hamada S, Yanaihara N & Ibata Y. (1989). VIP-like immunoreactive neurons and retinal projections in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 497, 374-7.

Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JH & van der Horst GT. (1999). Photic induction of *mPer1* and

mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286, 2531-4.

Okamura H, Yamaguchi S & Yagita K. (2002). Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 309, 47-56.

Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S & Wada K. (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1945-58.

Oster H, Yasui A, van der HoG & Albrecht U. (2002). Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes Dev.* 16, 2633-8.

Oster H, Werner C, Magnone MC, Mayser H, Feil R, Seeliger MW, Hofmann F & Albrecht U. (2003). cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr. Biol.* 13, 725-33.

P

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS & Hogenesch JB. (2002a). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109, 307-20.

Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I & Kay SA. (2002b). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213-6.

Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN & Hogenesch JB. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525-7.

Pandey HP, Ram A, Matsumura H, Satoh S & Hayaishi O. (1995). Circadian variations of prostaglandins D2, E2, and F2 alpha in the cerebrospinal fluid of anesthetized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 625-9.

Pandiella A & Massague J. (1991). Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming

growth factor-alpha precursor. *J. Biol. Chem.* 266, 5769-73.

Pando MP, Morse D, Cermakian N & Sassone-Corsi P. (2002). Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* 110, 107-17.

Patel DD, Knight BL, Wiggins D, Humphreys SM & Gibbons GF. (2001). Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR alpha-deficient mice. *J. Lipid Res.* 42, 328-37.

Pengelley ET & Asmundson SM. (1969). Free-running periods of endogenous circannual rhythms in the golden mantled ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 177-83.

Pengelley ET & Asmundson SM. (1970). The effect of light on the free running circannual rhythm of the golden-mantled ground squirrel. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 177-83

Pengelley ET, Asmundson SJ, Barnes B & Aloia RC. (1976). Relationship of light intensity and photoperiod to circannual rhythmicity in the hibernating ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 53, 273-7.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pevet P & Buijs RM. (2003). Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 17, 221-8.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Pevet P & Buijs RM. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur. J. Neurosci.* 19, 318-24.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Van Der Vliet J, Pevet P & Buijs RM. (2005). In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience* 130, 797-803.

Perrin JS, Segall LA, Harbour VL, Woodside B & Amir S. (2006). The expression of the clock protein PER2 in the limbic forebrain is modulated by the estrous cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5591-6.

Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD & Jockers R. (1999). Differential signaling of human Mella and Mellb melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* 58, 633-9.

- Pevet P. (2003). Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J. Neuroendocrinol.* 15, 422-6.
- Piggins HD & Loudon A. (2005). Circadian biology: clocks within clocks. *Curr. Biol.* 15, 455-7.
- Piketty V. (2001). Absence of sexual dimorphism in pars tuberalis [¹²⁵I]-melatonin binding sites of lambs slaughtered in June and in October. *J. Pineal Res.* 30, 50-5.
- Pitrosky B, Kirsch R, Vivien-Roels B, Georg-Bentz I, Canguilhem B & Pevet P. (1995). The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin- driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J. Neuroendocrinol.* 7, 889-95.
- Pitrosky B, Kirsch R, Malan A, Mocaer E & Pevet P. (1999). Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol.* 277, 812-28.
- Pitrosky B, Delagrange P, Rettori MC & Pevet P. (2003). S22153, a melatonin antagonist, dissociates different aspects of photoperiodic responses in Syrian hamsters. *Behav. Brain Res.* 138, 145-52.
- Pittendrigh CS. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25, 159-84.
- Pittendrigh CS. (1972). Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2734-7.
- Pizzio GA, Hainich EC, Ferreyra GA, Coso OA & Golombek DA. (2003). Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* 14, 1417-9.
- Poirel VJ, Masson-Pevet M, Pevet P & Gauer F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 946, 64-71.
- Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M & Gauer F. (2003). Contrary to other non-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 120, 745-55.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U & Schibler U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251-60.
- Prendergast BJ, Gorman MR & Zucker I. (2000). Establishment and persistence of photoperiodic memory in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5586-91.
- Prendergast BJ, Mosinger B Jr, Kolattukudy PE & Nelson RJ. (2002). Hypothalamic gene expression in reproductively photoresponsive and photorefractory Siberian hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16291-6.
- Prendergast BJ, Bilbo SD, Dhabhar FS & Nelson RJ. (2004). Effects of photoperiod history on immune responses to intermediate day lengths in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Neuroimmunol.* 149, 31-9.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP & Rollag MD. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 340-5.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF & Rollag MD. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20, 600-5.
- Provencio I, Rollag MD & Castrucci AM. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415, 493.
- Provost P, Dishart D, Doucet J, Frenthewey D, Samuelsson B & Radmark O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* 21, 5864-74.
- Ptitsyn AA, Zvonic S, Conrad SA, Scott LK, Mynatt RL & Gimble JM. (2006). Circadian clocks are resounding in peripheral tissues. *PLoS Comput. Biol.* 2, e16.

Q

Quay WB. (1970). Precocious entrainment and associated characteristics of activity patterns following pinealectomy and reversal of photoperiod. *Physiol. Behav.* 5, 1281-90.

Quintero JE, Kuhlman SJ & McMahan DG. (2003). The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J. Neurosci.* 23, 8070-6.

R

- Ralph MR & Menaker M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*. 241, 1225-7.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC & Menaker M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 24, 975-8.
- Rajaratnam SM & Redman JR. (1997). Effects of daily melatonin administration on circadian activity rhythms in the diurnal Indian palm squirrel (*Funambulus pennanti*). *J. Biol. Rhythms* 12, 339-47.
- Raspe E, Duez H, Gervois P, Fievet C, Fruchart JC, Besnard S, Mariani J, Tedgui A & Staels B. (2001). Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor RORalpha. *J. Biol. Chem.* 276, 2865-71.
- Recio J, Pevet P & Masson-Pevet M. (1998a). Regulation of melatonin receptors in the pars tuberalis of Syrian hamsters transferred from long to short photoperiod: implication of melatonin and testosterone. *J. Neuroendocrinol.* 10, 303-8.
- Recio J, Gauer F, Schuster C, Pevet P & Masson-Pevet M. (1998b). Daily and photoperiodic 2-125I-melatonin binding changes in the pars tuberalis of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): effect of constant light exposure and pinealectomy. *J. Pineal Res.* 24, 162-7.
- Reddy AB, Field MD, Maywood ES & Hastings MH. (2002). Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J. Neurosci.* 22, 7326-30.
- Reddy AB, Wong GK, O'Neill J, Maywood ES & Hastings MH. (2005). Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutat. Res.* 574, 76-91.
- Redlin U & Mrosovsky N. (1999). Masking of locomotor activity in hamsters. *J. Comp. Physiol.* 184, 429-37.
- Redlin U, Hattar S & Mrosovsky N. (2005). The circadian Clock mutant mouse: impaired masking response to light. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 191, 51-9.
- Redman JR. (1997). Circadian entrainment and phase shifting in mammals with melatonin. *J. Biol. Rhythms.* 12, 581-7.
- Redman J, Armstrong S & Ng KT. (1983). Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219, 1089-91.
- Redman JR & Armstrong SM. (1988). Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 5, 203-15.
- Reed HE, Cutler DJ, Brown TM, Brown J, Coen CW & Piggins HD. (2002). Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *J. Neuroendocrinol.* 14, 639-46.
- Reiter RJ. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* 1, 109-31.
- Reppert SM & Uhl GR. (1987). Vasopressin messenger ribonucleic acid in supraoptic and suprachiasmatic nuclei: appearance and circadian regulation during development. *Endocrinology* 120, 2483-7.
- Reppert SM & Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-41.
- Reppert SM, Coleman RJ, Heath HW & Keutmann HT. (1982). Circadian properties of vasopressin and melatonin rhythms in cat cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.* 243, 489-98.
- Reppert SM, Weaver DR & Ebisawa T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-85.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slangenaupt SA & Gusella JF. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8734-8.
- Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pevet P, & Simonneaux V. (1999). Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J. Biol. Rhythms* 14, 105-15.
- Ripperger JA & Schibler U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat. Genet.* 38, 369-74.

Robinson BG, Frim DM, Schwartz WJ & Majzoub JA. (1988). Vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei: daily regulation of polyadenylate tail length. *Science* 241, 342-4.

Roenneberg T & Merrow M. (2003). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13, 198-207.

Roenneberg T, Daan S & Merrow M. (2003). The art of entrainment. *J. Biol. Rhythms* 18, 183-94.

Rollag MD, Panke ES & Reiter RJ. (1980). Pineal melatonin content in male hamster throughout the seasonal reproductive cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 165, 330-4.

Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J & Buijs RM. (1997). Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2613-23.

Ross AW, Webster CA, Mercer JG, Moar KM, Ebling FJ, Schuhler S, Barrett P & Morgan PJ. (2004). Photoperiodic regulation of hypothalamic retinoid signaling: association of retinoid X receptor gamma with body weight. *Endocrinology* 145, 13-20.

Ruby NF, Dark J, Heller HC & Zucker I. (1998). Suprachiasmatic nucleus: role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Res.* 782, 63-72.

Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211-3.

Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB & Fitzgerald GA. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2, e377.

Rusak B & Yu GD. (1993). Regulation of melatonin-sensitivity and firing-rate rhythms of hamster suprachiasmatic nucleus neurons: pinealectomy effects. *Brain Res.* 602, 200-4.

Rutter J, Reick M, Wu LC & McKnight SL. (2001). Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* 293, 510-4.

S

Saboureau M, Masson-Pevet M, Canguilhem B & Pevet P. (1999). Circannual reproductive rhythm in the European hamster (*Cricetus cricetus*): demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod. *J. Pineal Res.* 26, 9-16.

Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T & Wada K. (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat. Genet.* 23, 47-51.

Sakakida Y, Miyamoto Y, Nagoshi E, Akashi M, Nakamura TJ, Mamime T, Kasahara M, Minami Y, Yoneda Y & Takumi T. (2005). Importin alpha/beta mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 280, 13272-8.

Sakanaka M, Magari S, Inoue N & Lederis K. (1990). Co-localization of arginine vasopressin- and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 260, 549-54.

Sanada K, Okano T & Fukada Y. (2002). Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J. Biol. Chem.* 277, 267-71.

Sanada K, Harada Y, Sakai M, Todo T & Fukada Y. (2004). Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes Cells* 9, 697-708.

Santa-Olalla J & Covarrubias L. (1995). Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon. *J. Neurosci. Res.* 42, 172-83.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J & Kouzarides T. (2002). Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-11.

Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A & Allis CD. (1999). Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285, 886-91.

- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA & Hogenesch JB. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527-37.
- Sato TK, Yamada RG, Ukai H, Baggs JE, Miraglia LJ, Kobayashi TJ, Welsh DK, Kay SA, Ueda HR & Hogenesch JB. (2006). Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat. Genet.* 38, 312-9.
- Schaap J, Albus H, VanderLeest HT, Eilers PH, Detari L & Meijer JH. (2003). Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15994-9.
- Schak KM & Harrington ME. (1999). Protein kinase C inhibition and activation phase advances the hamster circadian clock. *Brain Res.* 840, 158-61.
- Schoenheimer R. (1942). *The dynamic state of body constituents.* Cambridge: Harvard University Press.
- Schuhler S, Pitrosky B, Kirsch R & Pevet P. (2002). Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behav. Brain Res.* 133, 343-50.
- Schurov IL, McNulty S, Best JD, Sloper PJ & Hastings MH. (1999). Glutamatergic induction of CREB phosphorylation and Fos expression in primary cultures of the suprachiasmatic hypothalamus in vitro is mediated by co-ordinate activity of NMDA and non-NMDA receptors. *J. Neuroendocrinol.* 11, 43-51.
- Schwartz WJ & Reppert SM. (1985). Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* 5, 2771-8.
- Schwartz WJ, Coleman RJ & Reppert SM. (1983). A daily vasopressin rhythm in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 263, 105-12.
- Schwartz WJ, de la Iglesia HO, Zlomanczuk P & Illnerova H. (2001). Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 16, 302-11.
- Selby CP, Thompson C, Schmitz TM, Van Gelder RN & Sancar A. (2000). Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14697-702.
- Shav-Tal Y & Zipori D. (2002). PSF and p54(nrb)/NonO-multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.* 531, 109-14.
- Shaw D & Goldman BD. (1995). Gender differences in influence of prenatal photoperiods on postnatal pineal melatonin rhythms and serum prolactin and follicle-stimulating hormone in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 136, 4237-46.
- Shearman LP & Weaver DR. (1999). Photic induction of Period gene expression is reduced in Clock mutant mice. *Neuroreport.* 10, 613-8.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr & Reppert SM. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261-9.
- Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM & Weaver DR. (2000a). Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6269-75.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der HoG, Hastings MH & Reppert SM. (2000b). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-9.
- Sheng M, Thompson MA & Greenberg ME. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252, 1427-30.
- Shibata S, Oomura Y, Kita H & Hattori K. (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* 247, 154-8.
- Shibata S, Shiratsuchi A, Liou SY & Ueki S. (1984). The role of calcium ions in circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus neuron activity in rat hypothalamic slices. *Neurosci. Lett.* 52, 181-4.
- Shibata S, Newman GC & Moore RY. (1987). Effects of calcium ions on glucose utilization in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 426, 332-8.
- Shibata S, Cassone VM & Moore RY. (1989). Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.* 97, 140-4.

- Shibata S, Watanabe A, Hamada T, Ono M & Watanabe S. (1994). N-methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN in vitro. *Am. J. Physiol.* 267, 360-4.
- Shieh KR, Chu YS & Pan JT. (1997). Circadian change of dopaminergic neuron activity: effects of constant light and melatonin. *Neuroreport* 8, 2283-7.
- Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S, Loros JJ, Dunlap JC & Okamura H. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91, 1043-53.
- Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T & Tezuka M. (2005). Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12071-6.
- Shinohara K, Tominaga K, Isobe Y & Inouye ST. (1993). Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J. Neurosci.* 13, 793-800.
- Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H & Honma K. (1994). Circadian rhythms in the release of vasoactive intestinal polypeptide and arginine-vasopressin in organotypic slice culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 170, 183-6.
- Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H & Honma K. (1995). Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7396-400.
- Silver R, Lehman MN, Gibson M, Gladstone WR & Bittman EL. (1990). Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Res.* 525, 45-58.
- Silver R, Romero MT, Besmer HR, Leak R, Nunez JM & LeSauter J. (1996a). Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced Fos. *Neuroreport* 7, 1224-8.
- Silver R, LeSauter J, Tresco PA & Lehman MN. (1996b). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810-3.
- Silver R, Sookhoo AI, Lesauter J, Stevens P, Jansen HT & Lehman MN. (1999). Multiple regulatory elements result in regional specificity in circadian rhythms of neuropeptide expression in mouse SCN. *Neuroreport* 10, 3165-74.
- Simonneaux V & Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55, 325-95.
- Siomi H & Dreyfuss G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 345-53.
- Slotten HA, Pitrosky B & Pevet P. (1999). Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 14, 347-53.
- Slotten HA, Pitrosky B & Pevet P. (2000). Entrainment of rat circadian rhythms by melatonin does not depend on the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 876, 10-6.
- Slotten HA, Krekling S, Sicard B & Pevet P. (2002). Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicantha ansorgei*. *Behav. Brain Res.* 133, 11-9.
- Smith M & Carter DA. (1996). In situ hybridization analysis of vasopressin mRNA expression in the mouse hypothalamus: diurnal variation in the suprachiasmatic nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* 12, 105-12.
- Snodgrass-Belt P, Gilbert JL & Davis FC. (2005). Central administration of transforming growth factor-alpha and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters. *Brain Res.* 1038, 171-82.
- Sollars PJ, Smeraski CA, Kaufman JD, Ogilvie MD, Provencio I & Pickard GE. (2003). Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Vis. Neurosci.* 20, 601-10.
- Song CK & Bartness TJ. (1996). The effects of anterior hypothalamic lesions on short-day responses in Siberian hamsters given timed melatonin infusions. *J. Biol. Rhythms* 11, 14-26.
- Song CK, Bartness TJ, Petersen SL & Bittman EL. (1999). SCN cells expressing mt1 receptor mRNA coexpress AVP mRNA in Syrian and Siberian hamsters. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 229-32.

- Spiegel K, Oklejewicz M & Daan S. (2002). Restoration of self-sustained circadian rhythmicity by the mutant clock allele in mice in constant illumination. *J. Biol. Rhythms* 7, 520-5.
- Stark RI, Daniel SS, Husain MK, Zubrow AB & James LS. (1984). Effects of hypoxia on vasopressin concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of sheep. *Neuroendocrinology* 38, 453-60.
- Starkey SJ, Walker MP, Beresford IJ & Hagan RM. (1995). Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin in vitro. *Neuroreport* 6, 1947-51.
- Stehle J, Vanecek J & Vollrath L. (1989). Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J. Neural. Transm.* 78, 173-7.
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD & Reppert SM. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* 6, 384-93.
- Steiniger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold O & Gautvik KM. (1994). Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur. J. Biochem.* 225, 967-74.
- Steinlechner S, Jacobmeier B, Scherbarth F, Dernbach H, Kruse F & Albrecht U. (2002). Robust circadian rhythmicity of *Per1* and *Per2* mutant mice in constant light, and dynamics of *Per1* and *Per2* gene expression under long and short photoperiods. *J. Biol. Rhythms* 17, 202-9.
- Stephan FK & Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1583-6.
- Stetson MH, Ray SL, Creyau Miller N & Horton TH. (1989). Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters: II. The nature of the maternal signal, time of signal transfer, and the effect of the maternal signal on peripubertal reproductive development in the absence of photoperiodic input. *Biol. Reprod.* 40, 458-465.
- Stirling JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR & Loudon AS. (2001). Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J. Neuroendocrinol.* 13, 147-57.
- Stoeckel ME, Hindelang-Gertner C & Porte A. (1979). Embryonic development and secretory differentiation in the pars tuberalis of the mouse hypophysis. *Cell Tissue Res.* 198, 465-76.
- Stoeckel ME, Hindelang C, Klein MJ, Poissonnier M & Felix JM. (1994). Expression of the alpha-subunit of glycoprotein hormones in the pars tuberalis-specific glandular cells in rat, mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278, 617-24.
- Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH & Weitz CJ. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83.
- Strahl BD & Allis CD. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-5.
- Sturgill TW, Ray LB, Erikson E & Maller JL. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334, 715-8.
- Sugden D, McArthur AJ, Ajpru S, Duniec K. (1999). Piggins HD. Expression of *mt(1)* melatonin receptor subtype mRNA in the entrained rat suprachiasmatic nucleus: a quantitative RT-PCR study across the diurnal cycle. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 72, 176-82.
- Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H & Inouye ST. (2003). Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.* 13, 664-8.
- Sumova A & Illnerova H. (1996). Endogenous melatonin signal does not mediate the effect of photoperiod on the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 725, 281-3.
- Sumova A & Illnerova H. (2005). Effect of photic stimuli disturbing overt circadian rhythms on the dorsomedial and ventrolateral SCN rhythmicity. *Brain Res.* 1048, 161-9.
- Sumova A, Travnickova Z, Peters R, Schwartz WJ, Illnerova H. (1995a). The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7754-8.
- Sumova A, Travnickova Z & Illnerova H. (1995b). Memory on long but not on short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 200, 191-4.

Sumova A, Jac M, Sladek M, Sauman I & Illnerova H. (2003). Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J. Biol. Rhythms* 18, 134-44.

Sun X, Rusak B & Semba K. (2000). Electrophysiology and pharmacology of projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventromedial preoptic area in rat. *Neuroscience* 98, 715-28.

Sun X, Whitefield S, Rusak B & Semba K. (2001). Electrophysiological analysis of suprachiasmatic nucleus projections to the ventrolateral preoptic area in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1257-74.

Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G & Lee CC. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90, 1003-11.

Sutherland C & Cohen P. (1994). The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS Lett.* 338, 37-42.

Sutherland C, Leighton IA & Cohen P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296, 15-9.

Swaab DF, Pool CW & Nijveldt F. (1975). Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *J. Neural. Transm.* 36, 195-215.

Swiatek W, Tsai IC, Klimowski L, Pepler A, Barnette J, Yost HJ & Virshup DM. (2004). Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 13011-7.

T

Takahashi JS & Zatz M. (1982). Regulation of circadian rhythmicity. *Science.* 217, 1104-11.

Takahashi Y, Okamura H, Yanaihara N, Hamada S, Fujita S & Ibata Y. (1989). Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res.* 497, 374-7.

Takahata S, Ozaki T, Mimura J, Kikuchi Y, Sogawa K & Fujii-Kuriyama Y. (2000).

Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes Cells* 5, 739-47.

Takano A, Shimizu K, Kani S, Buijs RM, Okada M & Nagai K. (2000). Cloning and characterization of rat casein kinase I epsilon. *FEBS Lett.* 477, 106-12.

Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW & Okamura H. (1998a). A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVL. *EMBO J.* 17, 4753-9.

Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N & Okamura H. (1998b). A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 3, 167-76.

Tamarkin L, Westrom WK, Hamill AI, Goldman BD. (1976). Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* 99, 1534-41.

Tamarkin L, Hollister CW, Lefebvre NG & Goldman BD. (1977). Melatonin induction of gonadal quiescence in pinealectomized Syrian hamsters. *Science* 198, 953-5.

Tamaru T, Isojima Y, Yamada T, Okada M, Nagai K & Takamatsu K. (2000). Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J. Neurosci.* 20, 7525-30.

Tanaka M, Okamura H, Matsuda T, Shigeyoshi Y, Hisa Y, Chihara K & Ibata Y. (1996). Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: a double labeling in situ hybridization study. *Neurosci. Lett.* 215, 119-22.

Tecler-Mariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J & Buijs RM. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J. Comp. Neurol.* 406, 171-82.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M & Sakaki Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512-6.

Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H & Shibata S. (2003). Adrenergic regulation of clock

- gene expression in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6795-800.
- Tharun S & Parker R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell.* 8, 1075-83.
- Thomas EM & Armstrong SM. (1988). Melatonin administration entrains female rat activity rhythms in constant darkness but not in constant light. *Am. J. Physiol.* 255, 237-42.
- Thompson CL, Blaner WS, Van Gelder RN, Lai K, Quadro L, Colantuoni V, Gottesman ME & Sancar A. (2001). Preservation of light signaling to the suprachiasmatic nucleus in vitamin A-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11708-13.
- Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ & Mahadevan LC. (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* 18, 4779-93.
- Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourtou T, Herrup K, Harris RC, et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-4.
- Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF & Gillette MU. (2003a). Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J. Biol. Chem.* 278, 718-23.
- Tischkau SA, Weber ET, Abbott SM, Mitchell JW & Gillette MU. (2003b). Circadian clock-controlled regulation of cGMP-protein kinase G in the nocturnal domain. *J. Neurosci.* 23, 7543-50.
- Tischkau SA, Mitchell JW, Pace LA, Barnes JW, Barnes JA & Gillette MU. (2004). Protein kinase G type II is required for night-to-day progression of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 539-49.
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM, Ptacek LJ & Fu YH. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040-3.
- Tominaga K, Shinohara K, Otori Y, Fukuhara C & Inouye ST. (1992). Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3, 809-12.
- Tong Y, Guo H, Brewer JM, Lee H, Lehman MN & Bittman EL. (2004). Expression of haPer1 and haBmal1 in Syrian hamsters: heterogeneity of transcripts and oscillations in the periphery. *J. Biol. Rhythms* 19, 113-25.
- Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart JC, Kosykh V, Staels B. (2000). Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb α expression in liver. *Endocrinology* 141, 3799-806.
- Tourriere H, Chebli K & Tazi J. (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie* 84, 821-37.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM & Sassone-Corsi P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7728-33.
- Triqueneaux G, Thenot S, Kakizawa T, Antoch MP, Safi R, Takahashi JS, Delaunay F & Laudet V. (2004). The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 585-608.
- Tritschler L, Saboureau M, Pevet P & Bothorel B. (2006). A functional subdivision of the circadian clock is revealed by differential effects of melatonin administration. *Neurosci. Lett.* 396, 73-6.
- Tritschler L. (2006). Comprendre le fonctionnement de l'horloge circadienne par l'étude de trios de ses sorties : les rythmes de secretion de mélatonine et de corticostérone, et le rythme d'activité locomotrice. Manuscrit de thèse, université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR & Lechan RM. (1997). Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138, 3359-68.
- Turek FW, Earnest D & Swann J. (1982). Splitting of the circadian rhythm of activity of hamsters. In: Aschoff J, Daan S, Groos G, editors. *Vertebrate circadian systems*. Berlin: Springer 203-13.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS & Bass J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043-5.

U

Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y & Hashimoto S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418, 534-9.

Uhl GR & Reppert SM. (1986). Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232, 390-3.

V

Vakkuri O, Leppaluoto J & Vuolteenaho O. (1984). Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. *Acta. Endocrinol. (Copenh)* 152-7.

van den Pol AN. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.* 191, 661-702.

van den Pol AN. (1991). Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *J. Neurosci.* 11, 2087-101.

van den Pol AN & Tsujimoto KL. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15, 1049-86.

van den Pol A & Gorcs T. (1986). Synaptic relationships between neurons containing vasopressin, gastrin-releasing peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus: dual ultrastructural immunocytochemistry with gold-substituted silver peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 252, 507-21.

van den Pol A, Finkbeiner SM & Cornell-Bell AH. (1992). Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *J. Neurosci.* 12, 2648-64.

van den Top M, Buijs RM, Ruijter JM, Delagrè P, Spanswick D & Hermes ML. (2001). Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro

independent of their circadian rhythm. *Neuroscience* 107, 99-108.

van der Horst G, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH & Yasui A. (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-30.

van der Zee EA, Roman V, Ten Brinke O & Meerlo P. (2005). TGF α and AVP in the mouse suprachiasmatic nucleus: anatomical relationship and daily profiles. *Brain Res.* 1054, 159-66.

van Esseveldt KE, van der Geest BA, Duindam H, Rietveld WJ & Boer GJ. (1999). Circadian rhythmicity of vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of suprachiasmatic nucleus-lesioned and -grafted rats. *J. Biol. Rhythms* 14, 28-36.

van Esseveldt KE, Lehman MN & Boer GJ. (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 34-77.

van Gelder RN, Gibler TM, Tu D, Embry K, Selby CP, Thompson CL & Sancar A. (2002). Pleiotropic effects of cryptochromes 1 and 2 on free-running and light-entrained murine circadian rhythms. *J. Neurogenet.* 16, 181-203.

van Gelder RN, Wee R, Lee JA & Tu DC. (2003). Reduced pupillary light responses in mice lacking cryptochromes. *Science* 299, 222.

van Holde KE. (1988). Histone modifications. In *chromatin, springer series in molecular biology*, A. Rich, ed. (New York: Springer) 111-48.

Vandesande F, Dierickx K & DeMey J. (1975). Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res.* 156, 377-80.

Vanecek J. (1988). The melatonin receptors in rat ontogenesis. *Neuroendocrinology* 48, 201-3.

Vanecek J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78, 687-721.

Vanecek J & Kosar E. (1994). Ontogenesis of melatonin receptors in anterior pituitary and pars tuberalis of golden hamsters. *Physiol Res.* 43, 379-82.

Vanecek J & Watanabe K. (1998). Melatonin inhibits the increase of cyclic AMP in rat

suprachiasmatic neurons induced by vasoactive intestinal peptide. *Neurosci. Lett.* 252, 21-4.

Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH & Virshup DM. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4888-99.

Vitaterna MH & Turek FW. (1993). Photoperiodic responses differ among inbred strains of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Biol. Reprod.* 49, 496-501.

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW & Takahashi JS. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-25.

Vivien-Roels B, Pevet P, Masson-Pevet M & Canguilhem B. (1992). Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86, 239-47.

Vivien-Roels B, Pitrosky B, Zitouni M, Malan A, Canguilhem B, Bonn D & Pevet P. (1997). Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 85-94.

von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, Kopp MD, Dehghani F, Korf HW & Stehle JH. (1998). CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J. Neurosci.* 18, (24):10389-97.

von Gall C, Schneider-Huther I, Pfeffer M, Dehghani F, Korf HW & Stehle JH. (2001). Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ. *J. Neuroendocrinol.* 13, 313-6.

von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH & Stehle JH. (2002). Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat. Neurosci.* 5, 234-8.

von Gall C, Noton E, Lee C, Weaver DR. (2003). Light does not degrade the constitutively expressed BMAL1 protein in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 18, 125-33.

von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW. (2005). Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 508-11.

Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V & Staels B. (1998). The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J. Biol. Chem.* 273, 25713-20.

Vuillez P, Jacob N, Teclemariam-Mesbah R & Pevet P. (1996). In Syrian and European hamsters, the duration of sensitive phase to light of the suprachiasmatic nuclei depends on the photoperiod. *Neurosci. Lett.* 208, 37-40.

Vuillez P, Jacob N, Teclemariam-Mesbah R, Van Rossum A, Vivien-Roels B & Pevet P. (1998). Effect of NMDA receptor antagonist MK-801 on light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nuclei and on melatonin production in the Syrian hamster. *J. Neuroendocrinol.* 10, 671-7.

W

Wahli W, Braissant O & Desvergne B. (1995). Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more.... *Chem. Biol.* 2, 261-6.

Wakamatsu H, Takahashi S, Moriya T, Inouye ST, Okamura H, Akiyama M & Shibata S. (2001). Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* 12, 127-31.

Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, Brown GM & Wang YT. (1999). Differential modulation of GABAA receptor function by Mella and Mellb receptors. *Nat. Neurosci.* 2, 401-3.

Wang BC, Share L, Crofton JT & Kimura T. (1981). Changes in vasopressin concentration in plasma and cerebrospinal fluid in response to hemorrhage in anesthetized dogs. *Neuroendocrinology* 33, 61-6.

Wang Y, Osterbur DL, Megaw PL, Tosini G, Fukuhara C, Green CB & Besharse JC. (2001). Rhythmic expression of Nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse. *BMC Dev. Biol.* 1-9.

- Watanabe A, Hamada T, Shibata S & Watanabe S. (1994). Effects of nitric oxide synthase inhibitors on N-methyl-D-aspartate-induced phase delay of circadian rhythm of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 646, 161-4.
- Watanabe K, Vanecek J & Yamaoka S. (2000). In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res.* 877, 361-6.
- Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S & Yoshimura T. (2004). Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145, 1546-9.
- Watts AG, Swanson LW & Sanchez-Watts G. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258, 204-29.
- Weaver DR. (1999). The roles of melatonin in development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 199-214.
- Weaver DR & Reppert SM. (1996). The *Mel1a* melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8, 109-12.
- Weaver DR, Liu C & Reppert SM. (1996). Nature's knockout: the *Mel1b* receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol. Endocrinol.* 10, 1478-87.
- Weibel L, Rettori MC, Lesieur D, Delagrangue P, Renard P & Van Reeth O. (1999). A single oral dose of S 22153, a melatonin antagonist, blocks the phase advancing effects of melatonin in C3H mice. *Brain Res.* 829, 160-6.
- Welsh DK & Reppert SM. (1996). Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 706, 30-6.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M & Reppert SM. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.
- Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS & Kay SA. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.* 14, 2289-95.
- Wenger RH & Gassmann M. (1997). Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* 378, 609-16.
- Whitmarsh AJ & Davis RJ. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74, 589-607.
- Williams LM, Lincoln GA, Mercer JG, Barrett P, Morgan PJ & Clarke IJ. (1997). Melatonin receptors in the brain and pituitary gland of hypothalamo-pituitary disconnected Soay rams. *J. Neuroendocrinol.* 9, 639-43.
- Wilsbacher LD, Yamazaki S, Herzog ED, Song EJ, Radcliffe LA, Abe M, Block G, Spitznagel E, Menaker M & Takahashi JS. (2002). Photic and circadian expression of luciferase in *mPeriod1-luc* transgenic mice in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 489-94.
- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ & Harper JW. (1999). The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in κ B α and β -catenin and stimulates κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* 13, 270-83.
- Wittkowski W, Bergmann M, Hoffmann K & Pera F. (1988). Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res.* 251, 183-187.
- Wollnik F & Schmidt B. (1995). Seasonal and daily rhythms of body temperature in the European hamster (*Cricetus cricetus*) under semi-natural conditions. *J. Comp. Physiol.* 165, 171-82.
- Wollnik F, Breit A & Reinke D. (1991). Seasonal change in the temporal organization of wheel-running activity of the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Naturwissenschaften* 78, 419-22.
- Woodgett JR. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-8.
- Workman JL & Kingston RE. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545-79.
- Wu H, Xu H, Miraglia LJ & Crooke ST. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in

preribosomal RNA processing. *J. Biol. Chem.* 275, 36957-65.

Wuarin J & Schibler U. (1990). Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell* 63, 1257-66.

Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN & Herr W. (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev.* 17, 896-911.

Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH & Allis CD. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-72.

X

Xing J, Ginty DD & Greenberg ME. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959-63.

Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA & Greenberg ME. (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 18, 1946-55.

Xu L, Eu JP, Meissner G & Stamler JS. (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279, 234-7.

Y

Yagita K & Okamura H. (2000). Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* 465, 79-82.

Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT & Okamura H. (2002). Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J.* 21, 1301-14.

Yamaguchi S, Mitsui S, Miyake S, Yan L, Onishi H, Yagita K, Suzuki M, Shibata S, Kobayashi M & Okamura H. (2000a). The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr. Biol.* 10, 873-6.

Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S & Okamura H. (2000b). Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol. Cell Biol.* 20, 4773-81.

Yamaguchi S, Kobayashi M, Mitsui S, Ishida Y, van der Horst GT, Suzuki M, Shibata S & Okamura H. (2001). View of a mouse clock gene ticking. *Nature* 409, 684.

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M & Okamura H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302, 1408-12.

Yamamoto H, Nagai K & Nakagawa H. (1987). Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon. *Chronobiol. Int.* 4, 483-91.

Yamamoto S, Shigeyoshi Y, Ishida Y, Fukuyama T, Yamaguchi S, Yagita K, Moriya T, Shibata S, Takashima N & Okamura H. (2001). Expression of the Per1 gene in the hamster: brain atlas and circadian characteristics in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 430, 518-32.

Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamime T & Takumi T. (2004). Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol. Biol.* 5-18.

Yamamoto Y, Yagita K, Okamura H. (2005). Role of cyclic mPer2 expression in the mammalian cellular clock. *Mol. Cell Biol.* 25, 1912-21.

Yamase K, Takahashi S, Nomura K, Haruta K & Kawashima S. (1991). Circadian changes in arginine vasopressin level in the suprachiasmatic nuclei in the rat. *Neurosci. Lett.* 130, 255-8.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M & Tei H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-5.

Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M & Block GD. (2002). Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10801-6.

- Yan L & Silver R. (2002). Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1531-40.
- Yan L, Takekida S, Shigeyoshi Y & Okamura H. (1999). Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* 94, 141-150.
- Yan L, Miyake S & Okamura H. (2000). Distribution and circadian expression of dbp in SCN and extra-SCN areas in the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 59, 291-5.
- Yan L, Foley NC, Bobula JM, Kriegsfeld LJ & Silver R. (2005). Two antiphase oscillations occur in each suprachiasmatic nucleus of behaviorally split hamsters. *J. Neurosci.* 25, 9017-26.
- Yang Z & Sehgal A. (2001). Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 29, 453-67.
- Yang SH, Yates PR, Whitmarsh AJ, Davis RJ & Sharrocks AD. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol. Cell. Biol.* 18, 710-20.
- Yarden Y & Sliwkowski MX. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 127-37.
- Yasuo S, Watanabe M, Tsukada A, Takagi T, Iigo M, Shimada K, Ebihara S & Yoshimura T. (2004). Photoinducible phase-specific light induction of Cry1 gene in the pars tuberalis of Japanese quail. *Endocrinology* 145, 1612-6.
- Yasuo S, Watanabe M, Nakao N, Takagi T, Follett BK, Ebihara S & Yoshimura T. (2005). The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology* 146, 2551-4.
- Yellon SM, Kim K, Hadley AR & Tran LT. (2005). Time course and role of the pineal gland in photoperiod control of innate immune cell functions in male Siberian hamsters. *J. Neuroimmunol.* 161, 137-44.
- Yin L & Lazar MA. (2005). The orphan nuclear receptor Rev-erb α recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol. Endocrinol.* 19, 1452-9.
- Yokota S, Yamamoto M, Moriya T, Akiyama M, Fukunaga K, Miyamoto E & Shibata S. (2001). Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *J. Neurochem.* 77, 618-27.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Sieppka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M & Takahashi JS. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5339-46.
- Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C & Takahashi JS. (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2608-13.
- Yu W, Nomura M & Ikeda M. (2002). Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 933-41.

Z

- Zhang J, Dong X, Fujimoto Y & Okamura H. (2004). Molecular signals of Mammalian circadian clock. *Kobe J. Med. Sci.* 50, 101-9.
- Zhang X, McNeil GP, Hilderbrand-Chae MJ, Franklin TM, Schroeder AJ & Jackson FR. (2000). Circadian regulation of the lark RNA-binding protein within identifiable neurosecretory cells. *J. Neurobiol.* 45, 14-29.
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC & Bradley A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400, 169-73.
- Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A & Lee CC. (2001). Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105, 683-94.

Zhou QY & Cheng MY. (2005). Prokineticin 2 and circadian clock output. *FEBS J.* 272, 5703-9.

Zucker I, Boshes M & Dark J. (1983). Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrels. *Am. J. Physiol.* 244, 472-80.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR & Reppert SM. (1998). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20, 1103-10.

G. Annexes

Publications dans des journaux à comité de lecture.

Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pévet M, Pévet P, Vuillez P. (2003). Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience*. 118(2):317-22.

Dardente H, Menet JS, Challet E, Tournier BB, Pévet P, Masson-Pévet M. (2004). Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res*. 124(2):143-51.

Johnston JD(1), Tournier BB(1), Andersson H, Masson-Pévet M, Lincoln GA, Hazlerigg DG (2006). Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology*. 147(2):959-65. (1) joint first authors.

En préparation :

n°1. Tournier BB, Dardente H, Simonneaux V, Vivien-Roels B, Pévet P, Masson-Pévet M, Vuillez P. Clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei and *pars tuberalis* of the European hamster (*Cricetus cricetus*) is regulated by seasonal variations of the environment. *European Journal of Neuroscience*, *en révision*, n°1.

n°2. Tournier BB, Birkenstock J, Pévet P, Vuillez P. Adjustment of genes' expression to the change from long to short photoperiod in the Syrian hamster. *En préparation*, n°2.

n°3. Tournier BB, Dardente H, Vuillez P, Pévet P, Challet E. Expression of TGF α in a diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *En préparation*, n°3.

n°4. Wagner GC, Johnston JD, Tournier BB, Ebling FJP, Hazlerigg DG. Melatonin effects on rhythmic gene expression in the *pars tuberalis* of the Siberian Hamster (*Phodopus sungorus*). *European Journal of Neuroscience*, *En préparation*, n°4.

Présentations lors de congrès.

Communication orale :

BB Tournier, JS Menet, V Simonneaux, P Pévet et P Vuillez. (2004). Intégration de la photopériode par les noyaux suprachiasmatiques. *36ème congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Rennes.*

Communications affichées :

Benjamin B. Tournier, Jérôme Birkenstock, Paul Pévet & Patrick Vuillez. (2006). Un nouveau rôle pour Clock : construction du message saisonnier dans les noyaux suprachiasmatiques. *38ème congrès de la Société Francophone de Chronobiologie. Lyon.*

BB Tournier, J Birkenstock, P Pévet and P Vuillez. (2005). Adjustment of genes expression to the change from long to short photoperiod in the Syrian hamster. *Congress of the European Pineal and Biological Rhythms Society, Frankfort, Allemagne.*

J Johnston, BB Tournier, H Andersson, M Masson-Pévet, DG Hazlerigg, G Lincoln.(2004). Melatonin regulates clock genes' expression in the pituitary *pars tuberalis*. *British Society for Neuroendocrinology. Oxford, Royaume-Uni.*

BB Tournier, J Johnston , M Masson-Pévet, DG Hazlerigg, G Lincoln. (2004). Réponse des gènes horloges à la mélatonine dans la *pars tubéralis* de mouton. 37ème congrès de la Société Francophone de Chronobiologie. Strasbourg. *Communication récompensée par un "prix poster".*

BB Tournier, J Menet, H Dardente, VJ Poirel, A Malan, M Masson-Pévet, P Pévet, P Vuillez. (2003). Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of syrian hamster. *Mosbacher Kolloquium. Mosbach, Allemagne.*

BB Tournier, J Menet, H Dardente, VJ Poirel, A Malan, M Masson-Pévet, P Pévet, P Vuillez. (2003). Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of syrian hamster. *Neurex, Bale, Suisse.*

Les noyaux suprachiasmatiques (SCN) des mammifères sont le siège de l'horloge circadienne. Leur rythmicité endogène entraînée à 24 heures par le cycle jour/nuit, est générée par des boucles de régulations auto-entretenues de l'expression de "gènes horloges". Parmi eux, le gène *Clock* est impliqué dans l'activation de la transcription de la majeure partie des autres gènes horloges et aussi des "gènes de sortie" de l'horloge. Ces derniers permettent la transmission à l'organisme des informations rythmiques journalières. Ainsi, l'activité locomotrice et la synthèse de certaines hormones dont la mélatonine, sont des exemples de fonctions comportementales et physiologiques contrôlées par les SCN. Parallèlement à ces variations journalières, les animaux présentent une physiologie adaptée aux variations saisonnières de l'environnement. Ce repérage dans le temps annuel nécessite que les animaux intègrent les variations de la photopériode (durée d'éclairement sur 24 heures).

L'objectif de la thèse a été d'une part, de mettre en évidence que les SCN génèrent et distribuent des signaux rythmiques journaliers qui dépendent de la photopériode, d'autre part, de déterminer comment ces signaux sont décodés par l'une des cibles des SCN qu'est la *Pars tuberalis* (PT) de l'adénohypophyse, via la mélatonine.

Nos résultats montrent que dans les SCN, les profils rythmiques des ARNm des gènes horloges et de gènes de sortie de l'horloge, dépendent non seulement du cycle jour/nuit mais aussi de la photopériode. Le passage d'une photopériode longue à courte, a des répercussions plus rapides sur l'expression des gènes horloges que sur celle des gènes de sortie de l'horloge. La chronologie de ces modifications d'expression géniques montre que les SCN intègrent le changement de photopériode, que la mélatonine n'est pas nécessaire à cette intégration, et que les SCN construisent des messages saisonniers. De plus, le gène *Clock* semble particulièrement important dans ce fonctionnement saisonnier des SCN, y compris au cours de l'apparition de la physiologie annuelle "réfractaire à la photopériode".

Par ailleurs, dans la PT, nous montrons que l'expression des gènes horloges dépend également de la photopériode sous le contrôle de la mélatonine qui active l'expression de *Cry1* et inhibe celle des autres gènes horloges. A court terme, il apparaît que la mélatonine n'est pas nécessaire à l'expression des gènes horloges, sauf à celle de *Cry1*, mais on peut supposer qu'elle synchronise les cellules de la PT entre elles.

Ainsi, les SCN orchestrent les rythmes journaliers mais également saisonniers et les gènes horloges sont également impliqués dans la génération des rythmes saisonniers.