

# **THÈSE**

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE**

En vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ  
Neurosciences**

par

**Laurent TRITSCHLER**

**Comprendre le fonctionnement de l'horloge circadienne par l'étude  
de trois de ses sorties : les rythmes de sécrétion de mélatonine et de  
corticotérorone, et le rythme d'activité locomotrice.**

**Soutenue le 3 mars 2006 devant la commission d'examen :**

**Dr. Olivier Bosler  
Dr. Bruno Claustrat  
Pr. Marie-José Freund-Mercier  
Dr. Paul Pévet  
Dr. Michel Saboureau**

**Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Rapporteur interne  
Examineur  
Directeur de thèse**

Mon papa,

tu vois, je suis devenu grand, fort et ...

## **Un grand merci, aux miens...**

**A mes parents**, pour l'éducation et le savoir être que vous m'avez inculqués ainsi que pour le libre choix que vous m'avez toujours accordé, c'est à vous que dois d'être devenu l'homme que je suis, vous êtes formidables.

**A mon frère**, qui a mené ses brillantes études en même temps que moi et qui n'a pourtant jamais compté son précieux temps pour m'écouter.

**A mes grand mères** pour leur aide précieuse tant matérielle que morale.

**A l'ensemble de ma famille** qui n'a jamais cessé de m'encourager au cours de ces longues années de formation.

**A Anne**, ma moitié, qui m'a donnée tout son amour ainsi que toute son attention durant les dernières années de préparation de cette thèse, je t'aime.

## Remerciements

Je souhaiterais exprimer toute ma reconnaissance au **Dr. Mireille Masson-Pévet**, qui a cru en moi, contrairement à beaucoup d'autres. Elle m'a donné ma chance, en me permettant d'effectuer un DEA au sein de son laboratoire, malgré les résultats moyens obtenus lors de ma maîtrise et malgré une année d'arrêt de mes études. Sans nul doute, c'est l'excellence de l'encadrement dans son laboratoire qui m'a permis d'effectuer cette formation doctorale.

Ces travaux ont été menés sous la direction des **Drs. Michel Saboureau, Paul Pévet et Béatrice Bothorel**, leurs conseils avisés, leurs visions scientifiques, ainsi que leurs compétences techniques m'ont permis de mener à bien cette thèse dans un délai raisonnable.

Je remercie vivement les membres de ce jury qui ont eu l'obligeance de s'intéresser à ce travail et pris la peine de le juger. Le **Pr. Marie-José Freund-Mercier** qui par ses enseignements est à la base d'un bon nombre de mes connaissances en physiologie. Le **Dr. Bruno Claustrat** qui nous a permis de caractériser le glucocorticoïde dominant chez les différentes espèces disponibles au laboratoire. Le **Dr. Olivier Bosler** avec qui j'ai eu la chance d'échanger des idées lors de différents congrès.

Je tiens à remercier tout particulièrement le **Dr. Françoise Eclancher**, qui a eu la patience de reprendre la syntaxe de l'ensemble de ce manuscrit, sa tâche fut immense... Elle a été ma petite mère au laboratoire et elle a dû supporter mon caractère parfois *difficile*. Françoise, merci de tout cœur.

Merci également au **Pr. François Gauer** pour avoir pris le temps d'échanger avec moi ses opinions scientifiques sur divers problèmes ou résultats. Sa personne m'est d'autant plus agréable qu'il a comme moi un sens de l'humour sans aucune limite.

Je remercie aussi le **Dr. André Malan** pour sa disponibilité, il a su répondre à mes difficultés statistiques ou informatiques avec célérité et efficacité. Par ailleurs, nos discussions scientifiques ont été aussi pour moi une source de réflexions très fructueuses.

Je remercie le **Dr. Berthe Vivien-Roels**, ainsi que **Sylviane Gourmelen** pour leur aide ainsi que pour leur gentillesse.

Je remercie tous les *jeunes* de ce laboratoire, le **Dr. Virginie Gydé-Laurent** pour ses grandes qualités d'écoute. **Zeina Malek** qui en quelque sorte est ma petite sœur d'adoption. **Laurence Agez** qui a été non seulement ma secrétaire (!) mais aussi une amie sincère. Le **Dr. Caroline Graff** qui a essuyé les plâtres de l'ensemble des démarches administratives de la fin de thèse et qui m'en a fait profiter, merci et bonne chance pour la suite. **Benjamin Tounier**, mon maître nageur et mon initiateur des *afters*, qui est certainement à l'origine du bon esprit de groupe qui règne parmi les *jeunes* de ce laboratoire. Le **Dr. Jorge Mendoza** pour les discussions scientifiques passionnées que nous avons eues lors des thés scientifiques... **Céline Feillet** l'inimitable, à la fois transalpine et transatlantique... **Anthony Salingre & Emeline Umbrecht-Jenk**, dont j'ai la chance d'avoir l'amitié depuis longtemps, avant même qu'ils entreprennent eux-mêmes leur thèse, bonne chance à vous. Bon vent à **Florent Revel** qui arrive, lui aussi, au bout de cette formation si particulière. Bon courage et bonne chance aux derniers arrivés : **Aurélie Bégé, Corina Bobu, Laurent Nexon et Marc Cuesta**.

Merci enfin à tous les membres du laboratoire de neurobiologie des rythmes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Parce qu'il y a une vie en dehors du laboratoire, je tiens à saluer les membres du *service des sports du Vatican*. Le **Dr. Vanessa Gobert** (*alias* Sarah Bernhardt) avec qui je partage une passion sans limite pour le jeu, ainsi qu'une expérience *enrichissante* dans le milieu scientifique et universitaire. Ainsi que **Julie, Sophie, Ness, Fell, Wiz, Ben, Quentin** et **Vax**. Sans le savoir, vous m'avez tous beaucoup aidé dans ce travail, car vous m'avez permis de rire tous les jours, même si en vous retrouvant presque tous les midis je n'avais pas toujours le cœur léger. J'espère que longtemps encore nous pourrons rire ensemble, autour d'un jeu de carte, quoi qu'il arrive dans la vie de chacun d'entre nous.

## TABLE DES MATIERES

<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	<b>3</b>
<b>1. LES NOYAUX SUPRACHIASMATIQUES</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Anatomie</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Rythmicité</b>	<b>7</b>
1.2.1. Détermination génétique	7
1.2.2. Activité électrique	9
1.2.3. Importance du couplage	11
<b>1.3. Pilotage des rythmes par les SCN</b>	<b>12</b>
1.3.1. Effecteurs nerveux	12
1.3.2. Facteurs diffusibles	12
1.3.3. Relations SCN, oscillateurs périphériques	13
1.3.4. Contrôle des sécrétions endocrines / neuroendocrines	15
1.3.4.1. Axe hypogonadotrope	15
1.3.4.2. Contrôle de la sécrétion des glucocorticoïdes	17
1.3.4.2.1. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA)	17
1.3.4.2.2. Fonctionnement rythmique de l'axe HPA	18
1.3.4.2.3. Implication du système sympathique	18
1.3.4.2.4. Contrôle par les SCN	19
1.3.4.3. Sécrétion de mélatonine	20
<b>1.4. Entraînement des SCN</b>	<b>22</b>
1.4.1. Entraînement photique	22
1.4.2. Entraînement non-photique	26
<b>1.5. SCN et photopériodisme</b>	<b>27</b>
<b>2. SÉCRÉTION RYTHMIQUE DE MÉLATONINE</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Morphologie de la glande pinéale</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Innervation de la glande pinéale</b>	<b>28</b>
2.2.1. Innervation sympathique	28
2.2.2. Autres innervations	29
<b>2.3. Biosynthèse de la mélatonine</b>	<b>31</b>
2.3.1. Étapes de la biosynthèse	31
2.3.2. Régulation de la biosynthèse	31
2.3.3. Catabolisme	32

<b>2.4. Contrôle saisonnier</b>	<b>32</b>
<b>2.5. Effets physiologiques</b>	<b>33</b>
2.5.1. Récepteurs de la mélatonine	33
2.5.2. Action de la mélatonine sur l'horloge	33
2.5.3. Action de la mélatonine sur la <i>pars tuberalis</i>	34
2.5.4. Mélatonine et reproduction	34
<b>2.6. Effets chronobiotiques</b>	<b>35</b>
<b>2.7. Effet pharmacologique de la mélatonine exogène sur la mélatonine endogène</b>	<b>36</b>
<b>3. SÉCRÉTION RYTHMIQUE DE CORTICOSTÉRONÉ</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Généralités</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Régulation nerveuse sympathique de la glande surrénale : importance du nerf splanchnique</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Biosynthèse et biodisponibilité</b>	<b>39</b>
<b>3.4. Catabolisme</b>	<b>40</b>
<b>3.5. Effets physiologiques</b>	<b>40</b>
3.5.1. Récepteurs	40
3.5.2. Effets métaboliques	41
3.5.3. Effets immunitaires	41
3.5.4. Autres effets physiologiques	42
<b>B. OBJECTIFS</b>	<b>43</b>
<b>C. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>45</b>
<b>1. ANIMAUX</b>	<b>45</b>
<b>2. MICRODIALYSE</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Principe et propriétés de la microdialyse</b>	<b>45</b>
2.1.1. Principe de la microdialyse	45
2.1.2. Propriétés de la microdialyse	46
<b>2.2. Sonde de microdialyse</b>	<b>48</b>
2.2.1. Construction de la sonde transversale	48
2.2.2. Rendements de la sonde transversale	48
2.2.2.1. Rendements pour la mélatonine	48
2.2.2.2. Rendement pour la corticostérone	49

2.3. Chirurgie	51
<b>3. DIALYSE <i>IN VIVO</i></b>	<b>53</b>
<b>4. ACTIVITÉ LOCOMOTRICE</b>	<b>53</b>
4.1. Activité générale	53
4.2. Activité de roue	53
<b>5. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES</b>	<b>54</b>
<b>6. ANALYSE ET TRAITEMENT DES DONNÉES</b>	<b>55</b>
<b>D. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b>	<b>56</b>
1. EFFET DE LA MÉLATONINE EXOGÈNE SUR DEUX SORTIES DE L'HORLOGE : LES RYTHMES DE MÉLATONINE ET DE CORTICOSTÉRONNE.	56
2. LE RYTHME DE SÉCRÉTION DE LA CORTICOSTÉRONNE VARIE EN FONCTION DE LA PHOTOPÉRIODE	70
2.1. Chez le rat	70
2.2. Chez l' <i>Arvicanthis ansorgei</i>	91
<b>E. DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	<b>108</b>
1. ADMINISTRATION DE MÉLATONINE ET PHOTOPÉRIODE : DEUX STIMULI AVEC DES EFFETS DIFFÉRENTS SUR L'HORLOGE	108
2. LA SÉCRÉTION DE CORTICOSTÉRONNE : UNE SORTIE SAISONNIÈRE DE L'HORLOGE	109
3. L'HORLOGE : UNE NOUVELLE VISION DE SON ORGANISATION FONCTIONNELLE	112
<b>F. PERSPECTIVES</b>	<b>114</b>
<b>G. RÉFÉRENCES</b>	<b>118</b>



## Abréviations

**5,7-DHT** : 5,7 Dihydroxytryptamine

**5-HT** : Sérotonine ou 5 hydroxytryptamine

**5HTP** : 5-hydroxytryptophane

**8-OH-DPAT** : 8-hydroxy-2(*n*-propylamino)-tétralin

**AA-NAT** : Aryl-Acrylamine N- acétyl transférase

**Ach** : Acétylcholine

**ACTH** : Hormone corticotrope ou corticotropin

**ANOVA** : Analyse de la variance

**a.u.** : Unité arbitraire

**AVP** : Arginine vasopressine

**bHLH** : *Basic helix-loop-helix*

**BMAL1** : *Brain and muscle arnt like protein 1*

**BNST-OV** : Noyau ovale du noyau de la strie terminale / *oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis*

**AMPc** : Adénosine monophosphate Cyclique

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium

**Calb** : Calbindine

**CeA** : Amygdale centrale / *central amygdala*

**CGRP** : *Calcitonin gene-related peptide*

**CKIε** : Caseine kinase Iε

**CLOCK** : *Circadian locomotor output cycle kaput*

**CRE** : Élément de réponse à l'AMPc

**CREB** : Protéine se liant à CRE

**CRH** : *Corticotropin Releasing Hormone*

**CRY** : Cryptochrome

**CT** : Temps circadien / *circadian time*

**DD** : Obscurité constante / *dark - dark*

**DEC** : *Differentially expressed in chondrocytes protein*

**DMH** : Hypothalamus dorso-médian

**EGF** : Facteur de croissance de l'épiderme

**FSH** : Hormone folliculo-stimulante / *follicle stimulating hormone*

**GABA** : Acide-γ-amino-butyrrique

**GAD** : Décarboxylase de l'acide glutamique

**GFP** : Protéine verte fluorescente

**GHT** : Tractus géniculo-hypothalamique / *geniculo hypothalamic tract*

**GnRH** : Hormone libérant la gonadotropin / *gonadotropin releasing hormone*

**GR** : Récepteur des glucocorticoïdes

**GRE** : *Glucocorticoids response element*

**GRP** : Peptide libérant la gastrine

**HCRT** : Hypocrétine

**HIOMT** : Hydroxyindole-O-méthyltransférase

**HPA** : Hypothalamo-hypophyso-surrénalien / *hypothalamo-pituitary-adrenal*

**ICER** : *Inducible cAMP early repressor*

**icv** : Intra-cérébro-ventriculaire

**i.p.** : intrapéritonéal

**IGL** : Feuillet intergénéculé latéral / *intergeniculate leaflet*

**IML** : Colonne intermédiaire-latérale de la moelle épinière

**KO** : *Knock out*

**LD** : Alternance lumière – obscurité / *light - dark*

**LH** : Hormone lutéinisante / *luteinizing hormone*

**LL** : Lumière constante/ *light - light*

**LTP** : Potentialisation à long terme

**ME** : Éminence médiane

**MK-801** : (+)-5-méthyl-10,11-dihydroxy-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine

**MPOA** : Région médiane préoptique

**MR** : Récepteur des minéralo-corticoïdes

**NAS** : N-acétyl-sérotonine

**NE** : Noradrénaline

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**NPY** : Neuropeptide Y

**NST** : *Nucleus of the solitary tract*

**OT** : Ocytocine

**PACAP** : Polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire

**PAS** : *Period-arnt-sim*

**PER** : *Period*

**PHI** : Peptide histidine isoleusine

**PK2** : Prokinéticine 2

**PKA** : Protéine kinase A

**PKC** : Protéine kinase C

**PLC** : Phospholipase C

**PRC** : Courbe de réponse de phase / *phase response curve*

**PVN** : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus / *paraventricular nucleus*

**PVT** : Noyaux paraventriculaire du thalamus

**RHT** : Tractus rétino-hypothalamique / *retinohypothalamic tract*

**RIA** : Dosage radio-immunologique / *radio-immuno assay*

**ROR $\alpha$**  : *Retinoid-related orphan receptor  $\alpha$*

**SCG** : Ganglion cervical supérieur / *superior cervical ganglion*

**SCN** : Noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus / *suprachiasmatic nucleus*

**SEM** : Erreur standard / *standard error of the mean*

**SOM** : Somatostatine

**SP** : Substance P

**sPVN** : Noyaux subparaventriculaires

**TGF $\alpha$**  : *Transforming growth factor  $\alpha$*

**TH** : Tryptophane hydroxylase

**Trp** : Tryptophane

**TRH** : Hormone libérant thyrotropine / *thyroid releasing hormone*

**TSH** : Hormone stimulant la thyroïde

**TTX** : Tétréodotoxine

**VIP** : Peptide intestinal vasoactif

**Vip $^{-/-}$**  : KO du gène *Vip*

**Vipr2 $^{-/-}$**  : KO du gène *Vpac2*

**VPAC** : Récepteur du VIP/PACAP

**ZT** : Temps du Zeitgeber / *Zeitgeber Time*

## A. Introduction

La Terre tourne sur elle-même en 24 heures, imprimant ainsi une alternance régulière du jour et de la nuit. De plus, en une année, la terre tourne autour du soleil, imprimant ainsi les saisons. Ces cycles font varier considérablement les caractéristiques du milieu, qu'il s'agisse de la luminosité, de la température, de l'hygrométrie ou encore de la disponibilité alimentaire. A des latitudes tempérées telles que celles observées en France, des variations climatiques et photopériodiques saisonnières existent et modifient les caractéristiques du milieu. Pour leur survie, les espèces ont donc dû s'adapter à ces variations environnementales. Cette adaptation se traduit, pour de nombreuses espèces, par l'accouplement à une période précise de l'année, permettant ainsi la naissance des petits à la période la plus propice à leur survie. Cette adaptation s'est faite notamment grâce à la mise en place d'une horloge capables de se synchroniser et de distribuer à tout l'organisme un message temporel permettant l'anticipation des changements du milieu. Ainsi, cette horloge contribuent largement au fonctionnement harmonieux des organismes dans leur environnement.

Les variations temporelles, qu'elles soient journalières ou saisonnières, sont un élément constitutif de l'environnement. Pour étudier au mieux les animaux dans leur milieu, il faut tenir compte de ces variations temporelles rythmiques. Il est donc important d'étudier l'horloge permettant aux animaux d'être en phase avec leur environnement.

L'existence d'une horloge biologique a été mise en évidence pour la première fois en 1729 chez une plante : la sensitive, par d'Ortous de Mairan, qui a montré que l'ouverture et la fermeture des feuilles de cette plante perdurent en l'absence d'alternance jour/nuit. En 1832, de Candolle a montré que les mouvements de cette plante présentaient une période proche mais différente de 24 heures dans des conditions constantes, mettant ainsi en évidence l'existence d'une horloge capable de fonctionner de façon autonome (voir Canguilhem et Boissin, 1998). On parle d'horloge circadienne, *circa* signifiant autour et *dies* signifiant jour, qui présente donc une période d'environ 24 heures. D'où l'idée que ce n'est pas la lumière qui est à l'origine des rythmes observés, mais elle joue le rôle de synchroniseur. L'horloge oscillant de façon autonome, les facteurs d'information temporelle, photiques ou non, sont considérés comme des synchroniseurs ou *Zeitgeber*, les donneurs de temps, *Zeit* signifiant temps et *Geber* signifiant donneur. Chez les Mammifères, il a fallu attendre l'année 1972 pour

localiser l'horloge circadienne dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN) grâce à des expériences de lésions (Stephan & Zucker, 1972 ; Moore & Eichler, 1972). Après lésion de ces noyaux, la greffe de ces mêmes noyaux réinstalle une rythmicité, notamment celle de l'activité locomotrice ; la rythmicité observée présente la période endogène de l'animal qui est donneur du greffon. De même, la greffe d'hypothalamus embryonnaire de souris sauvages, à des souris mutantes arythmiques, en raison de l'inactivation de deux gènes horloge (KO *Cry1-Cry2*), rétablit une rythmicité de l'activité locomotrice chez les mutantes (Sujino *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus en greffant des SCN embryonnaires de hamster mutant *tau*, présentant un période endogène très courte d'environ 20 heures (Ralph & Menaker, 1988), à des hamsters sauvages ayant subi une lésion de l'horloge circadienne (Ralph *et al.*, 1990). Par ailleurs, la greffe de cellules isolées de SCN est suffisante pour rétablir une rythmicité de l'activité locomotrice à des animaux préalablement lésés (Silver *et al.*, 1990).

## **1. Les noyaux suprachiasmatiques**

### **1.1. Anatomie**

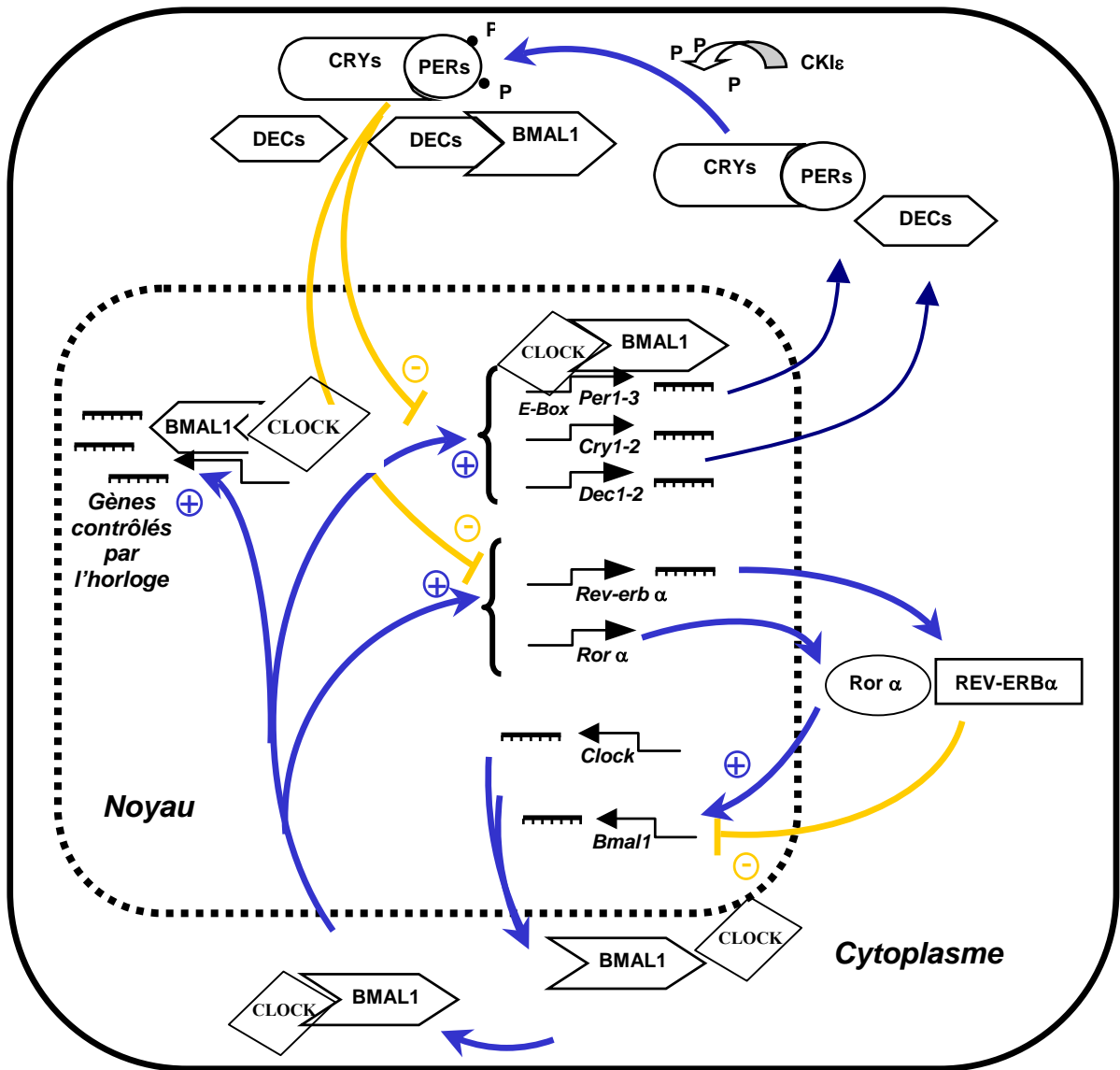
Les SCN sont deux petits noyaux cérébraux d'environ 10 500 neurones chacun (Ibata *et al.*, 1999 ; van Esseveldt *et al.*, 2000 ; Abrahamson & Moore 2001). Chez le rat, ils mesurent 400 µm de haut, 425 µm de large et 900 µm de longueur rostro-caudale (Van den Pol, 1991). Ces deux noyaux se situent de part et d'autre du troisième ventricule ventral, au-dessus du chiasma formé par la décussation des nerfs optiques.

La plupart des neurones des SCN sont gabaergiques (Moore & Speh, 1993). Les niveaux de transcription de l'ARNm de la glutamate décarboxylase (GAD), enzyme convertissant le glutamate en acide gamma-amino butyrique (GABA), présentent un rythme circadien dans les SCN. Il en va de même pour les niveaux de GABA et pour ceux de l'activité enzymatique de la GAD (Huhman *et al.*, 1996). Chez les rongeurs nocturnes, le GABA est libéré très fortement durant le jour (ou le jour subjectif correspondant à la période de repos lorsque les animaux sont placés en obscurité constante, DD), ainsi les SCN impriment un fort tonus inhibiteur à ses cibles durant cette période du nyctémère. Par ailleurs, la présence de quelques neurones glutamatergiques, mais aussi leur rôle fonctionnel, ont été montrés dans les SCN (Hermes *et al.*, 1996, Csaki *et al.*, 2000 ; Cui *et al.*, 2001 ;

Perreau-Lenz *et al.*, 2004). Ces neurones glutamatergiques projettent essentiellement sur les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN) (Csaki *et al.*, 2000).

L'étude des neuropeptides présents dans les SCN a permis de subdiviser ceux-ci en deux sous-parties anatomo-fonctionnelles : une partie ventro-latérale et une partie dorso-médiane (Moore, 1996). **La partie ventro-latérale des SCN** contient en majorité le **Peptide Vasoactive Intestinal (VIP)**. Dans les SCN, au moins chez le rat, ce neuropeptide est exprimé rythmiquement avec un maximum durant la nuit (Shinohara *et al.*, 1993 ; Isobe & Nishino, 1996). **Le Peptide libérant la Gastrine (GRP)** est un autre marqueur de la partie ventro-latérale des SCN (Mikkelsen *et al.*, 1991). Comme son nom l'indique, ce peptide stimule la libération de gastrine dans le tractus gastro-intestinal. Dans les SCN, le GRP peut être colocalisé avec le VIP (Romijn *et al.*, 1998). Tout comme le VIP, le GRP est exprimé rythmiquement avec un pic durant la nuit (Okamura & Ibata, 1994). **Le Peptide Histidine Isoleucine (PHI)**, proche du VIP sur le plan structural, présente comme lui, de forts niveaux d'expression au cours de la nuit (Card *et al.*, 1988 ; Mikkelsen & Fahrenkrug, 1994). Cette partie ventro-latérale des SCN est considérée comme la partie recevant l'information photique en provenance de la rétine. Chez le rat, cette information est véhiculée vers les SCN de manière directe, des cellules ganglionnaires de la rétine aux neurones à VIP *via* le tractus rétino-hypothalamique, mais aussi de manière indirecte, en passant par un relais intermédiaire qui sont les feuillets intergénéculés latéraux (IGL).

**La partie dorso-médiane des SCN** contient majoritairement de **l'arginine vasopressine (AVP)** (Swaab *et al.*, 1975 ; Vandesande *et al.*, 1975 ; van den Pol & Tsujimoto, 1985). Sa synthèse présente une variation nyctémérale avec un maximum durant le jour (Larsen *et al.*, 1994 ; Cagampang *et al.*, 1994 ; Isobe & Nishino, 1998). La **somatostatine** est un autre neuropeptide présent dans la partie dorso-médiane des SCN, il existe sous deux formes, une de 14 et une de 28 acides aminés, et présente une expression rythmique avec un pic durant le jour (Shinohara *et al.*, 1991 ; Fukuhara *et al.*, 1993).



Adapté de Challet *et al.*, 2003

**Figure 1** : Boucles moléculaires des régulations transcriptionnelles et traductionnelles des gènes horloge.

## 1.2. Rythmicité

### 1.2.1. Détermination génétique

C'est d'abord chez la drosophile que des gènes horloge ont été identifiés (Konopka & Benzer, 1971). *Clock* a été le premier gène horloge identifié chez un mammifère grâce à l'étude de la souris mutante *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput* ; Vitaterna *et al.*, 1994). Jusqu'à ce jour, onze gènes horloge impliqués dans la machinerie moléculaire des oscillations circadiennes ont été identifiés : *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1*, *Dec2*, *Rev-erba*, *Rora*, *Clock* et *Bmal1*. Les produits de ces gènes horloge interagissent et forment quatre boucles de régulations transcriptionnelles : deux boucles positives et deux boucles négatives (**Figure 1**).

**La première boucle positive** est essentielle, car elle entraîne les autres boucles. Elle implique *Clock* et *Bmal1*. CLOCK et BMAL1 sont de la famille des protéines bHLH-PAS, elles possèdent en effet le domaine PAS (Period ARNt Sim) permettant la dimérisation (homo ou hétéro) entre protéines possédant ce domaine et le domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) qui permet la fixation de ces protéines sur la double hélice d'ADN (Antoch *et al.*, 1997 ; Hogenesch *et al.*, 1997 ; 1998). *Clock* est exprimé de façon constante dans les SCN, que l'on considère son ARNm (Sun *et al.*, 1997 ; Tei *et al.*, 1997 ; Shearman *et al.*, 1997 ; Oishi *et al.*, 1998) ou sa protéine (Maywood *et al.*, 2003). Quant à *Bmal1*, il est exprimé rythmiquement, l'expression de son ARNm est maximale durant la nuit, ce qui induit un pic de la protéine BMAL en fin de nuit (Honma *et al.*, 1998 ; Tamaru *et al.*, 2000 ; Maywood *et al.*, 2003). Les hétérodimères CLOCK-BMAL1 activent la transcription en se liant à des séquences consensus E-box de l'ADN (Gekakis *et al.*, 1998 ; Hogenesch *et al.*, 1998). En particulier, CLOCK-BMAL1 active la transcription rythmique des neuf autres gènes horloge, acteurs des autres boucles.

**La première boucle négative** implique les gènes *Period* (*Per*), *Cryptochrome* (*Cry*) et *Dec* (*human protein Differentially Expressed in Chondrocytes*). Les PER présentent un domaine PAS mais pas de domaine bHLH. Chez les rongeurs, les ARNm des trois isoformes de *Per* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) sont exprimés rythmiquement dans les NSC (Sun *et al.*, 1997) avec un niveau élevé de jour. Ainsi, les quantités de protéines PER présentent un pic dans les SCN en fin de jour (Hastings *et al.*, 1999 ; Field *et al.*, 2000). Dans les SCN, les ARNm de *Cry1* et

de *Cry2* sont exprimés de façon rythmique avec un pic à la transition jour/nuit (Miyamoto & Sancar, 1998 ; Kume *et al.*, 1999 ; Okamura *et al.*, 1999). La quantité de CRY1 et de CRY2 présente un pic en début de nuit (Kume *et al.*, 1999). Les gènes *Dec* (*Dec1* et *Dec2*) codent pour DEC1 et DEC2 qui possèdent un domaine bHLH mais pas de domaine PAS. Ils sont exprimés rythmiquement dans les SCN avec un pic d'expression en début de jour (Honma *et al.*, 2002).

La transcription de ces sept gènes (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1* et *Dec2*) est activée par la fixation du dimère CLOCK-BMAL1 sur leurs E-box. Les PER et les CRY forment des homodimères et des hétérodimères en fin de nuit qui inhibent leur propre transcription ainsi que celle de *Bmal1*, de *Rev-erba* et de *Rora* en se fixant au dimère CLOCK- BMAL1 (Kume *et al.*, 1999 ; Griffin *et al.*, 1999 ; Shearman *et al.*, 2000). Les DEC inhibent l'effet du dimère CLOCK-BMAL1 d'une part, par compétition sur leurs sites de fixation (Honma *et al.*, 2002) et, d'autre part, par liaison à la séquence N-terminale de BMAL1 qui empêche le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

**La deuxième boucle négative** implique *Rev-erba*, gène codant un récepteur nucléaire orphelin. Dans les SCN, sa transcription est activée par le dimère CLOCK-BMAL1 et présente un pic en début de jour. Ainsi REV-ERB $\alpha$ , va inhiber la transcription de *Bmal1* (Preitner *et al.*, 2002).

**La deuxième boucle positive** mise en évidence récemment est composée des *Rora* (*Rora1* et *Rora4*), gènes de la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Leur transcription activée par le dimère CLOCK-BMAL1 présente un pic en milieu de jour (Sato *et al.*, 2004). Les ROR $\alpha$ , vont stimuler la transcription de *Bmal1* (Ueda *et al.*, 2002 ; Sato *et al.*, 2004 ).

**Les quatre boucles de régulations transcriptionnelles vont entraîner l'expression rythmique de nombreux autres gènes** (Panda *et al.*, 2002). Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes contrôlés par l'horloge demeurent encore largement méconnus. Toutefois, le dimère CLOCK-BMAL1, a été proposé comme candidat pour contrôler l'expression rythmique d'autres gènes (Jin *et al.*, 1999). Un de ces gènes parfaitement caractérisé est l'*Avp* dont l'expression est rythmique (§ 1.1) et dépend de la liaison du dimère CLOCK-BMAL1 sur l'E-box présente dans son promoteur (Jin *et al.*, 1999).



Pour réguler précisément la période d'oscillation de ces boucles, **les protéines horloges vont subir de nombreuses modifications post-traductionnelles**. En particulier la phosphorylation du dimère CLOCK-BMAL1 est importante, aussi bien pour sa translocation dans le noyau (Lee *et al.*, 2001) que pour son activité transcriptionnelle (Eide *et al.*, 2002 ; Sanada *et al.*, 2002). PER1 et PER2, elles aussi sont phosphorylées modifiant certainement l'inhibition du complexe PER-CRY sur leur propre transcription ainsi que sur celle de *Rev-erba* ou de *Rora*. Une des kinases semble très importante dans cette boucle, c'est la Caseïne Kinase Iε (CKIε), elle phosphoryle les PER, les CRY et BMAL1. La mutation spontanée de cette kinase est responsable du phénotype particulier du hamster mutant *tau*, dont la période endogène est très courte (Lowrey *et al.*, 2000). Par ailleurs l'état de phosphorylation des protéines horloges semble également jouer un rôle dans le contrôle de la dégradation de ces protéines par le protéasome (Akashi *et al.*, 2002 ; Yagita *et al.*, 2002).

### 1.2.2. Activité électrique

Les changements circadiens de la fréquence de décharge électrique des SCN sont l'une des manifestations les plus connues et les plus étudiées de l'horloge circadienne. Ces fréquences ont été mesurées aussi bien *in vivo* (Inouye & Kawamura, 1979) qu'*in vitro* sur des tranches de tissus (Green & Gillette, 1982 ; Shibata *et al.*, 1982). Ces résultats montrent que l'activité électrique a lieu de jour. En 1995, Welsh et coll. ont mesuré l'activité électrique des neurones de SCN dissociés. Dans cette étude, une culture de neurones dissociés est placée sur une puce dotée de 61 électrodes permettant l'enregistrement simultané de l'activité électrique de nombreuses cellules. Ainsi des cellules même très proches peuvent présenter des activités électriques de phases différentes. Les auteurs concluent toutefois que tous les neurones des SCN seraient rythmiques, alors que les neurones non rythmiques observés seraient d'une origine autre que les SCN. Cette conclusion est à l'évidence à rejeter. Des travaux menés à plus long terme utilisant la même méthode de *multielectrode array* montrent que, même dans des conditions d'obscurité constante, un rythme d'activité électrique des neurones des deux subdivisions des SCN (*ventro-latérale* et *dorso-médiane*) persiste (Nakamura *et al.*, 2001). Ces auteurs montrent également que des neurones non électriquement rythmiques existent dans les deux subdivisions de l'horloge.

De toute évidence, l'activité électrique d'un tissu nerveux est la caractéristique majeure de ce tissu, c'est de cette activité électrique que résultent les libérations de

neurotransmetteurs ou de neuropeptides. Les gènes horloge sont sans conteste à l'origine de l'horloge circadienne, il est donc très important de voir **quelles relations peuvent exister entre les oscillations moléculaires de l'horloge (celle des gènes horloge) et l'activité électrique des cellules des SCN**. L'activité électrique est bloquée par l'application de tétrodontoxine (TTX) et reprend rythmiquement après lavage de la TTX. Ceci a été observé *in vitro*, soit sur tranche de tissus (Shibata & Moore, 1993), soit sur cellules dissociées (Welsh *et al.*, 1995), ainsi *qu'in vivo* (Schwartz *et al.*, 1987). Ces résultats démontrent que l'activité électrique utilisée comme index de la fonction circadienne n'est pas une partie essentielle du mécanisme de l'horloge. L'activité électrique influe toutefois sur la phase des oscillations de l'horloge. En effet, une application de TTX pendant 4 heures sur des tranches de SCN bloque non seulement la transcription et la libération de l'AVP (Arima *et al.*, 2002) mais aussi modifie sa phase de libération (Noguchi & Watanabe, 2005). Ainsi, il est fort probable que l'activité électrique influe peu ou prou sur les boucles de régulation transcriptionnelle des gènes horloge, même s'il est évident que ces boucles sont à l'origine de la rythmicité de l'activité électrique décrite. La corrélation entre gènes horloge et activité électrique dans les SCN n'est pas encore formelle, toutefois quelques éléments expérimentaux tendent à la mettre en évidence. Le premier élément est que les souris doubles mutantes, à la fois pour *Cry1* et *Cry2* (KO *Cry1-Cry2*), ne montrent pas de rythmicité circadienne de la fréquence de décharge dans les SCN (Albus *et al.*, 2002), par ailleurs ces souris sont arythmiques. D'autres preuves très élégantes ont été apportées par le groupe de Mac Mahon. Ce groupe utilise une souche de souris chez lesquelles *Per1* est couplé à la GFP (*Green fluorescent protein*). Des tranches des SCN sont ainsi exposées à la microscopie à épifluorescence et en parallèle l'activité électrique des cellules est mesurée par *patch clamp*. Cette technique originale a permis de démontrer qu'il existait une corrélation entre les cellules exprimant *Per1* et les cellules ayant une activité électrique (Quintero *et al.*, 2003). Cette corrélation *Per1*-activité électrique est médiée par un changement de la conductance potassique des cellules exprimant *Per1* (Kuhlman & Mc Mahon, 2004). Autrement dit, les boucles de régulation des gènes horloge contrôleraient l'activité électrique des neurones par le contrôle de leur conductance potassique. Une autre preuve est qu'un créneau lumineux au cours de la nuit induit l'expression de *Per1* (Shigeyoshi *et al.*, 1997) dans la partie ventro-latérale des SCN et les cellules exprimant *Per1* montrent corrélativement une augmentation de l'activité électrique spécifique, due à un changement de conductance potassique (Kuhlman *et al.*, 2003).

### 1.2.3. Importance du couplage

Bien qu'une certaine hétérogénéité existe au sein des SCN, un couplage entre les cellules et, même entre les deux SCN, est nécessaire au bon fonctionnement de l'horloge. La nécessité de cette synchronisation est soulignée dans le travail de Ohta et coll. (2005), avec l'utilisation d'un modèle de souris transgénique dont le gène *Per1* est couplé au gène *Gfp* codant pour la protéine GFP fluorescente. Ces souris sont placées dans des conditions de lumière constante (LL pour *light/light*). Certaines deviennent arythmiques, d'autres restent rythmiques, et enfin un dernier groupe est nommé « *split* » parce-que ces souris présentent deux phases d'activité locomotrice distinctes dont les périodes peuvent être différentes. Ces auteurs montrent une désynchronie de la fluorescence des cellules de SCN pour les souris arythmiques, bien que la plupart des cellules prises individuellement restent rythmiques. Globalement les cellules restent synchronisées chez les animaux rythmiques, dans le groupe des souris « *split* », les cellules sont synchronisées dans chaque SCN, mais avec une phase différente si l'on considère le SCN gauche et le SCN droit.

La question du moyen de couplage des cellules au sein des SCN reste posée. Il semble que les synapses électriques que sont les jonctions GAP, couplent les neurones adjacents des SCN entre eux (Long *et al.*, 2005), ces jonctions permettent de synchroniser l'activité électrique de ces neurones. Cette synchronisation de l'activité électrique contribue à synchroniser les neurones des SCN si l'on considère l'expression des gènes horloge (Honma *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2003). La neurotransmission gabaergique participe également à la synchronisation des SCN (Liu & Reppert, 2000), en particulier, un réseau de neurones gabaergiques serait à l'origine de la communication entre les parties dorsale et ventrale des SCN (Albus *et al.*, 2005). Le VIP ainsi que son récepteur VPAC2 auraient aussi une fonction qui ne doit pas être négligée dans cette synchronisation car il a été montré que la souris mutante de ce récepteur (*Vipr*<sup>-/-</sup>) présente une activité locomotrice arythmique (Harmar *et al.*, 2002). Cette arythmie doit être la conséquence de la désynchronisation des neurones des SCN chez ces mutants ou chez les souris KO pour VPAC2 (Anton *et al.*, 2005). La glie astrocytaire joue aussi un rôle important dans la synchronisation des neurones des SCN car les astrocytes sont couplés entre eux par des jonctions GAP (Welsh & Reppert, 1996). Ces jonctions impliquent la connexine 43, elles sont donc différentes des jonctions GAP neuronales qui impliquent la connexine 36. Ainsi interconnectés, les astrocytes pourraient avoir un rôle

conséquent et efficace sur le couplage neuronal, notamment en modifiant la taille de leurs prolongements insérés entre les neurones des SCN.

### **1.3. Pilotage des rythmes par les SCN**

#### **1.3.1. Effecteurs nerveux**

Une des régions importantes de la projection des SCN est constituée par les SCN eux-mêmes. Ainsi, les fibres émanant de chaque noyau projettent sur leurs cibles, aussi bien de façon ipsilatérale, que controlatérale. (Buijs *et al.*, 1994; Leak *et al.*, 1999).

Une grande majorité des fibres efférentes des SCN projettent dans la région médiane de l'hypothalamus atteignant l'aire préoptique médiane (MPOA), les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), les noyaux subparaventriculaires (sPVN) et le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH). Les cibles extra-hypothalamiques des SCN sont les noyaux paraventriculaires du thalamus (PVT) et les feuillets intergénéculés latéraux (IGL). Parmi les cibles hypothalamiques des SCN, au moins trois types de neurones sont concernés. Le premier type consiste en des neurones endocrines synthétisant des neuropeptides hypophysiotropes tels que la CRH (*Corticotropin-Releasing Hormone*), la TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*) ou la GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) (Buijs *et al.*, 1993 ; Vrang *et al.*, 1995 ; Van Der Beek *et al.*, 1997 ; Kalsbeek *et al.*, 2000). Le deuxième type est représenté par les neurones appartenant au système autonome, dans les PVN. Les connections entre les SCN et le système autonome (sympathique ou parasympathique) ont été mises en évidence par des techniques de traçage viral rétrograde, depuis les organes innervés vers le système nerveux central (Teclerian-Mesbah *et al.*, 1997 ; Buijs *et al.*, 1999 ; Kalsbeek *et al.*, 2000 ; Buijs *et al.*, 2001 ; Bartness *et al.*, 2001). Pour le troisième type, ce sont des neurones intermédiaires, appelés interneurones, situés dans le MPOA, le sPVN, ainsi que le DMH. Ces neurones intermédiaires intègrent certainement l'information circadienne en provenance de l'horloge avec d'autres informations hypothalamiques, avant de projeter sur les neurones endocrines ou autonomes de l'hypothalamus.

#### **1.3.2. Facteurs diffusibles**

En plus de la communication nerveuse, les **SCN ont une communication par facteurs diffusibles**, notamment pour le contrôle de l'activité locomotrice. Ceci est étayé par

le fait que la lésion des différents noyaux cibles des SCN, cités précédemment, n'abolit jamais complètement le rythme d'activité locomotrice. L'existence de tels facteurs a été démontrée par la greffe de SCN, chez des animaux dont les SCN ont été préalablement lésés. La restauration de la rythmicité de l'activité locomotrice a lieu même si le greffon est placé dans le troisième ventricule, et même s'il est encapsulé dans une matrice dont la taille des pores (5 à 120 nm) ne permet pas l'établissement de synapses entre le greffon et les structures cérébrales de l'animal receveur (Silver *et al.*, 1996 ; pour revue voir Le Sauter & Silver, 1998). Deux facteurs diffusibles sont candidats pour contrôler l'activité locomotrice : le TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ) et la PK2 (prokinéticine 2).

Le TGF- $\alpha$  a une expression rythmique dans les SCN avec un maximum d'expression durant le jour subjectif. Son administration intra-cérébro-ventriculaire (icv) chez des souris, durant la nuit subjective, induit l'arrêt de leur activité locomotrice de roue. La cible probable du TGF- $\alpha$  sécrété par les SCN est les récepteurs à l'EGF (*epidermal growth factor*) (Kramer *et al.*, 2001). Ces récepteurs sont présents en nombre dans la zone subparaventriculaire (SPZ) qui se situe caudalement aux SCN, et dont l'implication dans le contrôle de l'activité locomotrice a été démontrée (Lu *et al.*, 2001).

La PK2 est exprimée rythmiquement dans les SCN avec des niveaux élevés durant le jour subjectif, et son administration icv chez des souris durant la nuit subjective diminue considérablement leur activité locomotrice (Cheng *et al.*, 2002). Par ailleurs, la présence de plusieurs E-box dans le promoteur du gène de la PK2 fait fortement suspecter que son expression dans les SCN est directement dépendante de la machinerie des gènes horloge. L'expression de son récepteur (PKR2) est limitée à quelques structures cibles des SCN, déjà cités, telles que les PVT ou les PVN.

### **1.3.3. Relations SCN, oscillateurs périphériques**

En 1997, Plautz et coll. montrent l'existence de gènes horloge dans la plupart des tissus de la drosophile. Ceci fut également montré chez les Mammifères, trois années plus tard (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Reppert et Weaver, 2002 pour revue). Ces tissus ou organes oscillants ont été nommés horloges périphériques. Mais ce terme d'horloge semble abusif, celui d'oscillateurs périphériques serait une meilleure définition pour ces tissus. En effet, pour mériter l'appellation d'horloge, il aurait fallu démontrer que ces tissus sont capables de distribuer l'information temporelle dont ils sont porteurs, ce qui reste encore à faire. Les

oscillateurs périphériques se différencient aussi de l'horloge principale par une bien moindre persistance de leurs oscillations *in vitro* (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Yamazaki *et al.*, 2002). Les études portant sur les oscillations de l'expression des gènes horloge dans les oscillateurs périphériques ont largement utilisé le modèle des fibroblastes en culture (Yagita *et al.*, 2001) et elles confirment un amortissement des oscillations. Toutefois, ces oscillations peuvent être relancées par différents facteurs tels que : le changement de milieu de culture, l'ajout de sérum à ce milieu (Balsalobre *et al.*, 1998) ou encore une application de glucocorticoïdes (Balsalobre *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'application de l'analogue des glucocorticoïdes, la dexaméthasone, induit le rythme des gènes horloge dans les tissus périphériques en culture et permet aussi d'y engendrer des décalages de phase, sans affecter pour autant l'expression des gènes horloge dans les SCN (Balsalobre *et al.*, 2000). L'amortissement des oscillations dans les oscillateurs périphériques ne résulte pas d'une perte de rythmicité mais de la désynchronisation des cellules entre elles (Nagoshi *et al.*, 2004 ; Welsh *et al.*, 2004).

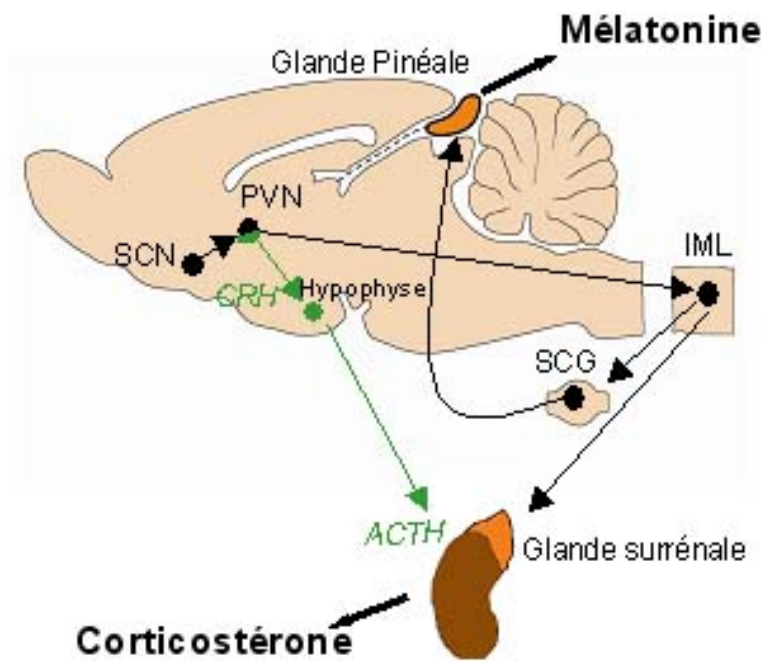
Les oscillateurs périphériques ont des périodes endogènes différentes de celles des SCN, ces périodes peuvent aussi être très variables d'un organe à l'autre. Chez la souris intacte mise en cycle LD, les oscillateurs périphériques sont tous entraînés avec une période de 24 heures, mais présentent un retard de phase par rapport aux SCN, l'expression de *Per 1* étant utilisée comme marqueur de la rythmicité (Yoo *et al.*, 2004). La dominance des SCN sur les oscillateurs périphériques a été formellement démontrée par Pando et coll. (2002) qui ont greffé des SCN de souris *Per1*<sup>-/-</sup>, présentant une période endogène courte, chez des souris sauvages ayant subi au préalable une lésion des SCN. Ils ont constaté que la période d'oscillation des fibroblastes était alors entraînée à une période proche de celle des SCN greffés. Ainsi, les SCN servent en quelque sorte de « chef d'orchestre » et imposent un fonctionnement harmonieux aux oscillateurs périphériques en contrôlant la libération de facteurs diffusibles ou humoraux qui peuvent synchroniser et décaler l'expression de leurs rythmes comme cela a été démontré *in vitro* (Balsalobre *et al.*, 1998). *In vivo*, les mêmes facteurs existent, auxquels s'ajoute la connexion nerveuse entre les SCN et les différents oscillateurs périphériques. Bien que tous ces moyens de contrôle des SCN ne s'excluent pas mutuellement, il apparaît cependant que tous les organes sièges des oscillateurs périphériques n'y sont pas sensibles de la même manière. Ainsi, le cœur, le muscle strié squelettique et la rate seraient largement dépendants de la connexion nerveuse, alors que le foie et le rein seraient plus dépendants de facteurs humoraux diffusibles (Guo *et al.*, 2005). Cette différence

majeure entre les différents oscillateurs périphériques implique de les considérer plutôt individuellement que dans leur ensemble.

### **1.3.4. Contrôle des sécrétions endocrines / neuroendocrines**

#### *1.3.4.1. Axe hypogonadotrope*

**L'axe hypogonadotrope est constitué de trois parties** : premièrement l'**étage hypothalamique** sécrétant de manière pulsatile de la GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) de façon pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire ; deuxièmement, sous l'action de la GnRH, l'**hypophyse** libère dans la circulation générale les hormones gonadotropes, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Ces deux hormones vont contrôler la sécrétion des hormones sexuelles (estrogènes et progestérone chez les femelles, testostérone chez les mâles) par les **gonades**, constituant la troisième partie de ce système. Des études de lésions, chez la ratte, ont révélé que l'aire préoptique médiane (MPOA) ainsi que les SCN sont les deux structures cérébrales indispensables à la génération du pic pré-ovulatoire de LH. La MPOA contient les neurones à GnRH ainsi que les récepteurs aux estrogènes. Les SCN quant à eux distribuent l'information temporelle journalière. De plus, tous les 4 ou 5 jours, le rétrocontrôle positif du pic pré-ovulatoire d'estrogènes ainsi que l'information circadienne induisent une activité cohérente des neurones à GnRH de la MPOA. Ces neurones libèrent alors massivement de la GnRH dans l'éminence médiane de l'hypophyse (ME) qui en réponse génère le pic pré-ovulatoire de LH le jour du proestrus. Des études anatomiques montrent dans la MPOA une innervation vasopressinergique dense, qui provient pour l'essentiel des SCN (Hoorneman & Buijs, 1982 ; De La Iglesia *et al.*, 1995 ; Watson *et al.*, 1995 ). La présence des récepteurs V1a de l'AVP a d'ailleurs été décrite dans la MPOA (Ostrowski *et al.*, 1994 ; Funabashi *et al.*, 2000a). Le rôle de l'AVP sur l'axe reproducteur a été mis en évidence par l'administration icv d'AVP lors d'expériences chez des rattes réceptrices, ce qui a eu pour conséquence d'inhiber leur comportement de lordose (Södersten *et al.*, 1983 ; 1985). Par ailleurs, l'administration d'AVP chez des rattes intactes durant la deuxième moitié du jour permet d'établir un pic de LH (Palm *et al.*, 2001). Il en va de même, chez des rattes ayant subi une lésion des SCN et qui ont ainsi perdu la faculté de générer ce pic de LH (Funabashi *et al.*, 2000b ; Palm *et al.*, 1999). Il apparaît donc que les SCN jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'axe reproducteur, la MPOA étant la cible privilégiée, mais d'autres groupes mineurs de neurones à GnRH répartis dans l'hypothalamus peuvent aussi être la cible des SCN (Van Der Beek *et al.*, 1993 ; 1997).



**Figure 2 :** Représentation schématique des voies de contrôle des sécrétions de mélatonine et de corticostérone par les SCN



### 1.3.4.2. Contrôle de la sécrétion des glucocorticoïdes

#### 1.3.4.2.1. Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA)

L'axe HPA (pour *hypothalamo-pituitary-adrenal*) est organisé selon **trois régions (Figure 2)**. L'**hypothalamus** via les noyaux paraventriculaires (PVN) libère la CRH (*Corticotropin-Releasing Hormone*) et l'AVP dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. En réponse, l'**antéhypophyse**, deuxième région, va sécréter la corticotrophine (ACTH ou AdrenoCorticoTropin Hormone) dans la circulation générale. Enfin, la troisième région constituée par le cortex surrénalien ou **corticosurrénale** va répondre à la présence d'ACTH par une libération de glucocorticoïdes (corticostérone chez le rat ou cortisol chez l'Homme). Le pic de glucocorticoïdes se produit à la transition jour/nuit chez un rongeur nocturne tel que le rat. La corticostérone sécrétée exerce un rétrocontrôle négatif à la fois sur la sécrétion de CRH et sur celle d'ACTH (Keller-Wood & Dallman, 1984). L'axe HPA est par ailleurs fortement activé dans des conditions de stress engendrant de forts taux plasmatiques de corticostérone. Il convient donc d'éviter que l'animal utilisé pour toute étude physiologique soit stressé.

Les PVN, noyaux hypothalamiques responsables de la sécrétion de CRH, sont constitués d'environ 15000 neurones chacun (Kiss *et al.*, 1983) et sont une cible privilégiée des SCN. Les neurones constituant les PVN peuvent être subdivisés en trois catégories. La première catégorie est représentée par les neurones magnocellulaires libérant l'ocytocine (OT) et l'AVP. Ils interviennent essentiellement dans le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme (Kjaer, 1993). La deuxième catégorie est constituée par un sous-ensemble de neurones parvocellulaires innervant le tronc cérébral et la moelle épinière. Cette catégorie de neurones innerve les cellules préganglionnaires parasympathiques du noyau moteur dorsal du nerf vague ainsi que les cellules préganglionnaires sympathiques de la colonne intermedio-latérale de la moelle épinière (IML) (voir Swanson & Sawchenko, 1983 pour revue). Ces neurones se situent dans les régions dorsales et caudales des PVN, et influent sur de nombreuses fonctions physiologiques telles que la fonction cardiovasculaire (Ciriello & Calaresu, 1980), la synthèse de mélatonine et la libération de corticostérone (voir chapitres suivants). Enfin, un autre sous-ensemble de neurones parvocellulaires constitue la troisième catégorie. Ils libèrent du neuropeptide hypophysiotrope TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*) qui va réguler la sécrétion de l'hormone thyroïdienne (TSH ou ThyreoStimuline

Hormone) par l'hypophyse, ou la CRH co-libérée avec l'AVP, qui contrôle la libération d'ACTH par l'antéhypophyse.

#### ***1.3.4.2.2. Fonctionnement rythmique de l'axe HPA***

L'axe corticotrope présente une activité rythmique nycthémerale (synchronisée sur l'alternance jour/nuit et donc de période égale à 24h exactement) ou circadienne (période endogène autour de 24h).

Chez les espèces à activité nocturne, comme le rat, la rythmicité des sécrétions hormonales (CRH, ACTH ou corticostérone) se caractérise par des pics de libération en fin de phase diurne (autour de la transition jour/nuit). Chez les espèces à activité diurne, comme l'homme, la rythmicité s'exprime par des pics hormonaux en fin de phase nocturne (autour de la transition nuit/jour). Dans les deux cas l'activation de la fonction corticotrope constitue une réponse anticipatoire sur la période d'activité à venir qui demande une mobilisation accrue des réserves énergétiques pour faire face à l'éveil. Dans le cas de l'Arvicanthis, espèce à activité principale diurne, deux pics de corticostérone ont été décrits aux transitions jour/nuit et nuit/jour (Verhagen et al., 2003).

De plus, des variations nycthémerales et saisonnières de l'activité de l'axe corticotrope ont été mises en évidence chez des espèces nocturnes ou diurnes soumises aux variations saisonnières et photopériodiques de leur environnement (Saboureau et al., 1979, 1980 [hérisson] ; Hiebert et al., 2000 [oiseau-mouche] ; Majsa and Peczely, 1976 [poulet] ; Gower et al., 1996 [lemmings]).

#### ***1.3.4.2.3. Implication du système sympathique***

L'amplitude du rythme d'ACTH observé ne permet pas de justifier à elle seule l'amplitude du rythme de corticostérone plasmatique observée. Un autre acteur doit entrer en jeu pour permettre l'établissement du rythme de corticostérone. Des expériences de lésion et de stimulation du nerf splanchnique ont montré que le système sympathique est le maillon manquant pour l'établissement de ce rythme dans des conditions physiologiques (Jasper & Engeland, 1994 ; 1997). Le système sympathique contrôle ainsi la sensibilité de la corticosurrénale à l'ACTH (Kaneko *et al.*, 1981 ; Sage *et al.*, 2002). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer ce contrôle de la sensibilité. Le contrôle du flux sanguin, au sein même de

la glande, semble toutefois être l'hypothèse la plus probable dans la mesure où le nerf splanchnique contrôle directement le diamètre des vaisseaux sanguins dans la corticosurrénale (voir Breslow, 1992 pour revue).

#### ***1.3.4.2.4. Contrôle par les SCN***

Après lésion des SCN, la perte de la rythmicité de la sécrétion de corticostérone montre que l'horloge circadienne contrôle cette sécrétion endocrine (Moore & Eichler, 1972 ; Buijs *et al.*, 1993a). Les deux systèmes décrits précédemment sont impliqués: l'axe HPA et le système sympathique. La lésion des SCN fait perdre la rythmicité de la sécrétion d'ACTH (Szafarczyk *et al.*, 1981), ce qui s'explique par la lésion des projections des SCN *via* les neurones à CRH des PVN (Buijs *et al.*, 1993b). Des traçages rétroviraux ont démontré l'existence d'une connexion entre la glande surrénale et les SCN, passant par le nerf splanchnique, l'IML et les PVN (Buijs *et al.*, 1999).

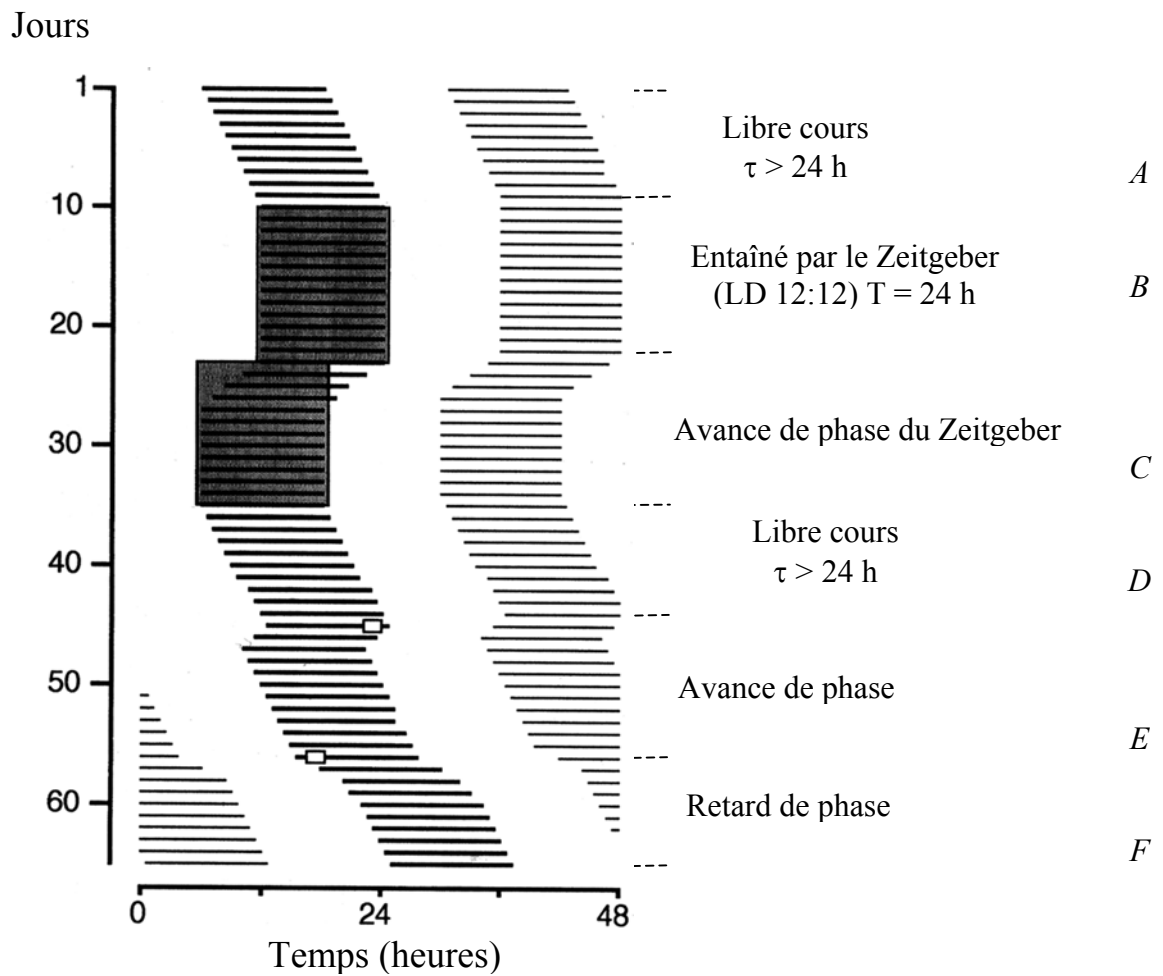
L'importante libération d'AVP par les terminaisons des SCN à proximité des neurones à CRH laisse supposer que l'AVP est un acteur important du contrôle circadien de la sécrétion de corticostérone (Kalsbeek & Buijs, 1992). Il a été montré que l'injection d'AVP dans la région des PVN a un effet inhibiteur sur la libération de corticostérone (Kalsbeek *et al.*, 1992 ; Wotjak *et al.*, 1996 ; Gomez *et al.*, 1997). Ainsi l'AVP sécrétée par les SCN, au cours de la deuxième moitié du jour (Kalsbeek *et al.*, 1995), permet d'inhiber la sécrétion de corticostérone. De plus, la diminution de la sécrétion d'AVP par les SCN en début de nuit, permet l'établissement du pic de corticostérone observé lors de la transition jour/nuit, chez un rongeur nocturne tel que le rat (Kalsbeek *et al.*, 1996a). Ce rôle inhibiteur de l'AVP n'est pas commun, car ce neuropeptide a généralement un effet excitateur et il s'agirait plutôt d'une levée d'inhibition supposant l'existence d'interneurones inhibiteurs entre les SCN et les PVN. Ces interneurones seraient gabaergiques et seraient situés dans la zone sous-paraventriculaire de l'hypothalamus (sPVN) ainsi que dans l'hypothalamus dorso-médian (DMH) (Hermes *et al.*, 2000), et de là projetteraient vers les PVN. Un autre facteur, stimulateur de la libération de corticostérone émanant des SCN, a été mis en évidence mais n'a pas encore été identifié (Kalsbeek *et al.*, 1996b).

#### 1.3.4.3. *Sécrétion de mélatonine*

La sécrétion nocturne de mélatonine par la glande pinéale est sous le contrôle exclusif des SCN puisqu'aucun autre facteur influe sur sa sécrétion. La lésion des SCN engendre une perte complète de la rythmicité de la sécrétion de la mélatonine (Klein & Moore, 1979 ; Perreau-Lenz *et al.*, 2003). La glande pinéale est reliée aux SCN par une voie polyneurone mise en évidence par des traçages rétrogrades (**Figure 2**). Depuis la glande pinéale, les marquages concernent successivement plusieurs relais appartenant au système sympathique : les ganglions cervicaux supérieurs (SCG), l'IML ainsi que les PVN (Larsen, 1999 ; Tecclemariam-Mesbah *et al.*, 1999).

Le GABA, libéré par les SCN dans les PVN pendant le jour (ou jour subjectif si les animaux sont placés en obscurité constante, DD), constitue un signal inhibiteur de la voie conduisant à la glande pinéale et donc de la sécrétion de mélatonine. Ainsi, l'application d'un antagoniste gabaergique dans les PVN durant le jour subjectif, stimule la sécrétion de mélatonine, alors que l'application d'un agoniste du GABA durant la nuit subjective, inhibe la sécrétion de mélatonine (Kalsbeek *et al.*, 1996c ; 1999 ; 2000). Il existe un second message émanant des SCN qui est stimulateur de la sécrétion pendant la nuit. L'application de MK801 (antagoniste des récepteurs NMDA) dans les PVN a permis d'identifier la nature glutamatergique de ce second message. Lorsque cet antagoniste est appliqué durant la nuit subjective, il entraîne une diminution significative de la sécrétion de mélatonine (Perreau-Lenz *et al.*, 2004). Le glutamate est donc libéré au cours de la nuit, par les efférences des SCN aux PVN, pour permettre l'établissement du pic nocturne de la sécrétion de mélatonine.

Les neurones parvocellulaires latéraux et dorsaux des **PVN projettent sur l'IML** dans les trois segments supérieurs de la moelle épinière (Cechetto & Saper, 1988 ; Tecclemariam-Mesbah *et al.*, 1997b). Ces neurones sont vasopressinergiques ou ocytocinergiques et l'application de ces deux neuropeptides dans l'IML, engendre une diminution de l'activité électrique des SCG (Gilbey *et al.*, 1982) et donc une inhibition de la sécrétion de mélatonine. L'**IML** constitue l'élément préganglionnaire du système sympathique, ces neurones sont cholinergiques (Kasa *et al.*, 1991) et projettent sur la partie rostrale des SCG pour les stimuler (Strack *et al.*, 1988 ; Reuss *et al.*, 1989). Il est possible que certains neuropeptides tels que le CGRP ou le PACAP modulent les effets de cette libération cholinergique (Yamamoto *et al.*, 1989 ; May *et al.*, 1998). De plus, 0,5 à 1 % des neurones



**Figure 3 :** **Propriétés de l'horloge : démonstration expérimentale.** Le rythme d'activité locomotrice d'un animal nocturne figure en double représentation, l'axe horizontal couvre une période de 48 heures successives, les jours sont représentés de haut en bas. La partie A montre l'activité locomotrice en libre cours avec  $\tau > 24$  h observée en DD. En B, entraînement de la période endogène par un Zeitgeber (tel que le cycle LD) avec une période  $T = 24$  h. En C, entraînement après une avance de phase du Zeitgeber. En D, le libre cours reprend avec les mêmes caractéristiques que celles observées en A. L'activité de l'horloge circadienne est décalée par un seul créneau lumineux (rectangle blanc) ce qui entraîne, soit une avance de phase si la lumière est appliquée en fin de nuit (E), soit un retard de phase si la lumière est appliquée en début de nuit (F). (Adapté de Wollnik, 1989).

des SCG, élément sympathique postganglionnaire, envoient des projections noradrénergiques sur la glande pinéale (Bowers, *et al.*, 1984 ; Larsen, 1999) qui vont permettre la synthèse et la sécrétion de mélatonine pendant la nuit.

#### **1.4. Entraînement des SCN**

En condition d'obscurité constante (condition dite en libre cours) les animaux expriment de façon stable et robuste un rythme (par exemple : activité locomotrice ou température corporelle). Dans ces conditions, chez des animaux nocturnes, tel que le rat, le début de l'activité est défini comme étant l'heure CT12 (*circadian time 12*). La période endogène observée, dénommée  $\tau$  (*tau*), est génétiquement déterminée par les boucles de régulation des gènes horloge (voir §1.2.1). Ce  $\tau$  varie peu d'un animal à l'autre à l'intérieur d'une même espèce, mais peut être compris dans une gamme de 20 à 28 heures selon les espèces en considérant l'ensemble des Mammifères (Aschoff & Pohl, 1978). Lors d'une alternance d'un cycle de lumière-obscurité (LD) de 24 heures (par exemple 12 heures de lumière – 12 heures d'obscurité ou LD 12:12), la période endogène de l'horloge circadienne est entraînée exactement à 24 heures par ce Zeitgeber. Le Zeitgeber impose au rythme endogène de s'ajuster à cette période T (Daan & Pittendrigh, 1976 ; Pittendrigh, 1981). Si  $\tau$  est supérieur à T, le rythme doit alors subir une avance de phase pour s'ajuster à la nouvelle période T et inversement, si  $\tau$  est inférieur à T un retard de phase doit avoir lieu.

De simples créneaux de lumière appliqués à des animaux en DD peuvent modifier la phase des rythmes circadiens observés en engendrant des changements transitoires de la période endogène. Si des créneaux appliqués au cours du jour subjectif n'ont aucun effet, des créneaux de lumière donnés en début de nuit subjective engendrent un retard de phase, alors qu'ils induisent une avance de phase s'ils sont appliqués durant la deuxième moitié de la nuit subjective (**Figure 3**). L'ensemble de ces résultats permettent d'établir une courbe de réponse de phase (PRC pour *phase response curve*, **Figure 4**).

##### **1.4.1. Entraînement photique**

Le cycle LD est le Zeitgeber du système circadien le plus puissant. Chez les Mammifères, la **synchronisation par la lumière se fait par l'intermédiaire des yeux**, l'énucléation engendrant l'observation d'un libre cours chez des animaux en LD. Toutefois, des animaux aveugles, n'ayant ni cônes, ni bâtonnets montrent un entraînement de leurs

rythmes par l'alternance du jour et de la nuit. Dans l'œil, il doit donc exister un photorécepteur circadien différent des cônes et des bâtonnets (Foster & Hankins, 2002). Il s'agit de la mélanopsine des cellules ganglionnaires (Berson, 2003). Originellement identifiée dans la peau de Xénope (Provencio *et al.*, 1998), elle fut ensuite retrouvée dans quelques cellules ganglionnaires de la rétine de la souris (Provencio *et al.*, 2000 ; Provencio *et al.*, 2002). Les axones de ces cellules ganglionnaires se projettent sur les SCN, participant à la formation du tractus rétino-hypothalamique (Gooley *et al.*, 2001 ; Hannibal *et al.*, 2002 ; Hattar *et al.*, 2002). Il semble donc que la mélanopsine soit le photorécepteur circadien qui permet de synchroniser l'horloge. Cependant, l'inactivation chez la souris dont le gène codant pour la mélanopsine, par la technique du *knock-out*, montre que l'horloge est toujours synchronisée par l'alternance du jour et de la nuit (Panda *et al.*, 2002, Ruby *et al.*, 2002). Un autre mutant de souris n'ayant ni mélanopsine, ni cônes, ni bâtonnets, perd cette fois sa capacité à être entraîné par la lumière (Hattar *et al.*, 2003 ; Panda *et al.*, 2003). **Le système visuel de détection de la lumière par les cônes et les bâtonnets, et le système non visuel, impliquant la mélanopsine des cellules ganglionnaires, sont donc complémentaires pour l'entraînement des Mammifères à l'alternance du jour et de la nuit.**

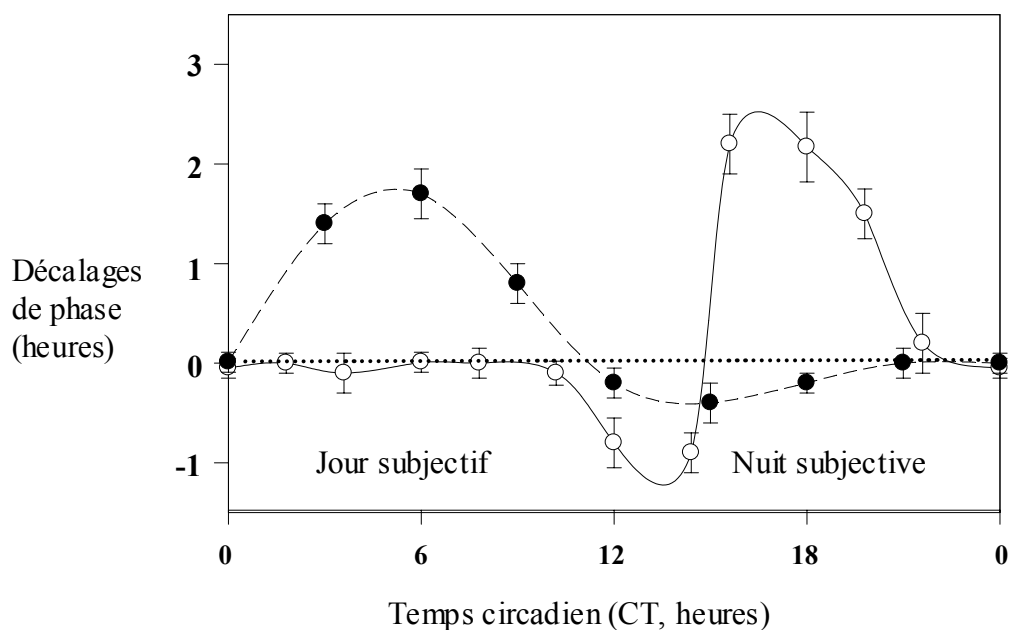
**Le tractus rétino-hypothalamique (RHT) est la voie principale de l'entrée de l'entraînement photique.** En effet, sa destruction bloque l'entraînement de l'activité par la lumière (Johnson *et al.*, 1988). Les fibres projettent sur les neurones de la partie ventro-latérale des SCN exprimant le VIP ou le GRP (Van den Pol & Tsujimoto, 1985 ; Tanaka *et al.*, 1993). La présence de lumière induit la libération de glutamate et de PACAP par les axones composant le RHT (Meijer & Rietveld, 1989 ; Castel *et al.*, 1993 ; pour revue Hannibal, 2002). Le glutamate libéré active les neurones des SCN certainement *via* des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA ; Ding *et al.*, 1994 ; Shibata *et al.*, 1994).

Il existe aussi une voie indirecte qui conduit l'information photique de la rétine aux SCN. Cette voie amène l'information photique de la rétine aux feuillets intergénéralés latéraux (IGL) (Hickey & Spear, 1976), puis les IGL projettent sur les SCN *via* le **tractus géniculo-hypothalamique (GHT)**. Cette projection utilise le GABA et le neuropeptide Y (NPY) (Harrington *et al.*, 1985 ; Card & Moore 1989 ; Morin *et al.*, 1992). Ainsi, les fibres immunoréactives au NPY forment des contacts synaptiques sur les neurones à VIP dans la partie ventro-latérale des SCN (Hisano *et al.*, 1988). Cette voie n'apparaît cependant pas essentielle pour l'entraînement des rythmes par le cycle LD. En effet, la lésion des IGL, qui

détruit ce tractus, n'élimine pas l'entraînement par le cycle LD (Harrington & Rusak, 1986 ; Pickard *et al.*, 1987). Par contre, elle diminue la vitesse d'entraînement par la lumière (Dark & Asdourian, 1975 ; Harrington & Rusak, 1986). Cette voie aurait donc **un rôle de modulateur de l'entraînement photique** (Albers *et al.*, 1991).

Si l'horloge est entraînée par la lumière, le mécanisme même de l'horloge étant régi par au moins les onze gènes horloge préalablement cités, il n'est pas étonnant de constater que la lumière a un effet sur certains de ces gènes. Ainsi, trois d'entre eux sont inductibles par la lumière : *Per1* (Shigeyoshi *et al.*, 1997), *Per2* (Sherman *et al.*, 1997) et *Dec1* (Honma *et al.*, 2002). Leur induction est rapide et a lieu durant la nuit subjective. *Per1* et *Dec1* sont induits indifféremment durant toute la nuit subjective, alors que *Per2* n'est induit fortement que si le créneau lumineux est présenté en début de nuit subjective (Albrecht *et al.*, 1997). Ces gènes horloge seraient donc acteurs des décalages de phases observés en réponse aux diverses stimulations lumineuses. Ceci est étayé par le fait que les avances de phases induites par la lumière sont perturbées chez des souris mutantes pour *Per1*. De même, les retards de phases induits par la lumière sont perturbés chez des souris mutantes pour *Per2* (Albrecht *et al.*, 2001).





**Figure 4 :** Courbes de réponse de phase pour des stimulations photiques (points blancs) ou non-photiques (points noirs). (Adapté de Challet *et al.*, 2003)

### 1.4.2. Entraînement non-photique

Bien qu'il soit le plus puissant, le cycle LD n'est pas le seul synchroniseur de l'horloge circadienne. D'autres synchroniseurs se sont révélés capables de décaler ou d'entraîner les rythmes d'activité chez les rongeurs. Ces facteurs, dits non-photiques, n'ont en commun que le fait d'être différents de la stimulation lumineuse, et d'un point de vue physiologique, la plupart d'entre eux induisent des avances de phases lorsqu'ils sont appliqués durant le jour subjectif (**Figure 4**). Dans la description qui suit, les effets de ces facteurs non-photiques, ont été étudiés en DD.

**L'activation comportementale** des hamsters dorés durant le jour subjectif est un des facteurs non-photiques le mieux étudié. La procédure standard consiste à mettre à la disposition d'un hamster doré une nouvelle roue. Généralement la présence de cette roue va inciter l'animal à courir, ce qui va décaler la phase des rythmes. Contrairement aux décalages de phase observés avec des créneaux lumineux, la présence de la roue va engendrer des avances de phase pendant le jour subjectif et de faibles retards pendant la nuit subjective (**Figure 4**) (Reebs & Mrosovsky, 1989 ; Bobrzynska & Mrosovsky 1998). L'activation comportementale a également un effet sur les gènes horloge qui est totalement opposé à celui observé avec les facteurs photiques, c'est-à-dire une diminution de la transcription de *Per1* et de *Per2* le jour subjectif (Maywood *et al.*, 1999), alors que la lumière induisait la transcription de ces gènes durant la nuit subjective.

D'autres facteurs sont également capables d'engendrer une activation comportementale et donc capables de modifier la période de l'horloge circadienne. C'est le cas des injections de benzodiazépines, telles que le triazolam (Van Reeth & Turek, 1989 ; Cutrera *et al.*, 1994a) ou de la morphine (Marchant & Mistlberger, 1995) qui induisent des avances de phase si elles sont appliquées durant le jour subjectif.

**La mélatonine**, hormone sécrétée par la glande pinéale et dont l'action est importante tant au niveau circadien que saisonnier (voir plus loin), est un autre facteur non-photique. À des doses supra-physiologiques, cette hormone engendre des avances de phase lorsqu'elle est appliquée en fin de jour subjectif (Armstrong & Chesworth, 1987). De plus, une application chronique de mélatonine est capable de synchroniser l'horloge, aussi bien

chez des rongeurs nocturnes (Redman *et al.*, 1983 ; Pitrosky *et al.*, 1999) que diurnes (Slotten *et al.*, 2002).

**La restriction alimentaire**, à la fois calorique et temporelle, est elle aussi, un facteur non-photique capable de modifier la phase de l'horloge circadienne et de l'entraîner (Challet *et al.*, 1997). Par contre, une restriction temporelle de l'accès à la nourriture seule ne synchronise qu'une partie de l'activité locomotrice (l'activité anticipatoire), alors qu'une deuxième partie continue à s'exprimer en libre cours (Mistlberger, 1994). Ceci démontre qu'il existe une autre horloge, différente de l'horloge circadienne : l'horloge alimentaire qui induit cette activité anticipatoire, mais cette horloge n'a pas encore été localisée.

### **1.5. SCN et photopériodisme**

La photopériode représente la durée relative du jour sur la période de 24 heures. Chez certains mammifères saisonniers, tels que le hamster doré, une photopériode courte induit l'arrêt de l'activité sexuelle qui se traduit par une atrophie des testicules. Une lésion des SCN effectuée chez des hamsters sexuellement actifs, empêche la régression de leurs testicules si ces derniers sont placés en photopériode courte (Rusak & Morin, 1976). Ainsi, les SCN auraient la capacité d'intégrer la photopériode, ceci se traduit par des modifications à différents niveaux, aussi bien moléculaires, que cellulaires. Tout d'abord l'expression des gènes horloge est affectée par des changements de photopériode de façon durable même si les animaux sont ensuite placés en obscurité constante. En particulier, une variation de la transcription de *Per 1* en fonction de la photopériode a été décrite chez les hamsters dorés et sibériens (Messenger *et al.*, 1999 ; 2000 ; Tournier *et al.*, 2003 ; voir Schwartz *et al* 2001 *pour revue*). Il en est de même pour les protéines PER1 et PER2 (Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000). L'activité électrique des neurones de SCN mis en culture est également affectée par la photopériode, la durée du pic d'activité électrique étant corrélée avec la durée relative du jour précédent l'expérimentation (Mrugala *et al.*, 2000). Cet effet de la photopériode se retrouve également sur l'expression et la sécrétion des neuropeptides des SCN, en particulier de l'AVP (ARNm : Jac *et al.*, 2000, peptide : Duncan *et al.*, 1995). Cette implication de l'AVP, sortie de l'horloge dépendant directement des boucles de régulation transcriptionnelles des gènes horloge, souligne le fait que les SCN, non seulement intègrent l'information photopériodique, mais la distribuent aussi.

## **2. Sécrétion rythmique de mélatonine**

### **2.1. Morphologie de la glande pinéale**

La glande pinéale résulte d'une évagination du toit du diencephale. Chez la plupart des Mammifères, elle forme une masse compacte entre l'habenula et les commissures postérieures. Chez les rongeurs, la majeure partie de la glande a migré suivant l'axe rostro-caudal pour former une glande superficielle située dans l'axe central du cerveau entre les hémisphères cérébraux et le cervelet. Cette glande pinéale superficielle représente la majeure partie de la glande bien qu'elle soit encore liée, par sa tige, à une partie dite profonde sur le toit du troisième ventricule. La glande superficielle des rongeurs est abondamment innervée et présente une vascularisation très dense dans laquelle la mélatonine est libérée. Toutefois, la glande pinéale profonde est aussi constituée de pinéalocytes fonctionnels capables de synthétiser la mélatonine (Ribelayga *et al.*, 1998 ; Garidou *et al.*, 2001). A partir de cette partie profonde de la glande, la mélatonine pourrait être libérée directement dans le liquide céphalorachidien du troisième ventricule dorsal comme cela a déjà été démontré chez le mouton (Tricoire *et al.*, 2002 ; Tricoire *et al.*, 2003). Au cours la phylogenèse, la glande pinéale a subi de nombreuses modifications (Korf *et al.*, 1998). Contenant de vrais photorécepteurs chez les vertébrés inférieurs, elle est exclusivement constituée de cellules neuroendocrines chez les Mammifères, sans sensibilité directe à la lumière. Toutefois, les pinéalocytes expriment encore quelques marqueurs de photorécepteurs, tel que l'antigène S (Korf *et al.*, 1985) ou la rhodopsine kinase (Somers & Klein, 1984). Ainsi, la glande pinéale des Mammifères pourrait être considérée comme un tissu tendant à l'homogénéité avec une énorme majorité de pinéalocytes, très peu de cellules gliales, quelques cellules phagocytaires et quelques rares neurones.

### **2.2. Innervation de la glande pinéale**

#### **2.2.1. Innervation sympathique**

L'innervation sympathique de la glande pinéale est le principal lien avec l'horloge circadienne, les SCN sont en effet connectés à la glande pinéale *via* une voie polysynaptique impliquant successivement les PVN, l'IML et enfin les SCG (voir paragraphe 1.3.4.3). L'IML est l'élément pré-ganglionnaire cholinergique qui projette sur la partie rostrale des SCG, élément post-ganglionnaire. Les SCG contiennent les neurones noradrénergiques colocalisées

avec le NPY, et projettent sur la glande pinéale (Zhang *et al.*, 1991). Seulement 0,5 à 1% des neurones des SCG projettent vers la glande pinéale (Bowers *et al.*, 1984 ; Larsen *et al.*, 1999). Ils projettent dans le parenchyme de la glande superficielle, sans contact direct avec les pinéaloctes, et cette innervation demeure néanmoins très dense (voir Korf, 1996 pour revue). La ganglionectomie (ablation des SCG) induit une disparition complète de l'immunoréactivité pour la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de la biosynthèse de la noradrenaline (NE) (Zhang *et al.*, 1991), ce qui montre que toute la NE libérée dans la glande pinéale est d'origine sympathique.

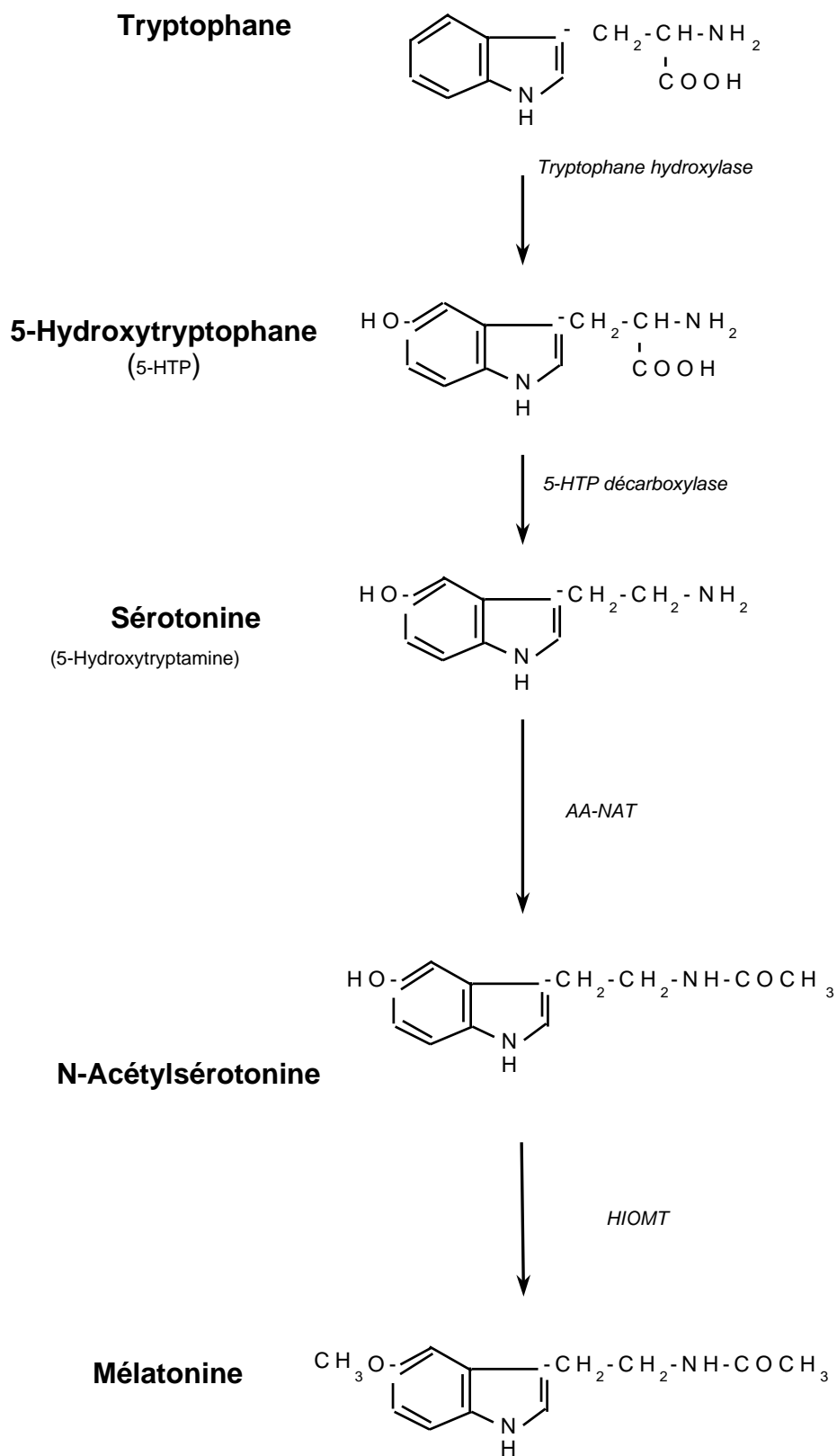
### **2.2.2. Autres innervations**

La ganglionectomie ne supprime pas toute l'innervation de la glande pinéale (Lin *et al.*, 1975 ; Schneider *et al.*, 1981 ; Moller & Korf, 1983) , ce qui laisse supposer qu'il existe une autre innervation que l'innervation sympathique. La glande pinéale apparaît ainsi innervée par plusieurs structures cérébrales qui sécrètent essentiellement des neuropeptides, notamment les noyaux habénulaires, les noyaux de la commissure postérieure, les PVN et l'IGL. Il s'agit principalement d'OT (Buijs & Pévet, 1980 ; Ronnekleiv & Kelly, 1984).

Il existe aussi des fibres histaminiques provenant des noyaux tubero-mammillaires (Mikkelsen *et al.*, 1992), ainsi que des fibres sérotoninergiques provenant du raphé dorsal (Leander *et al.*, 1998), et enfin des fibres à hypocrotine (HCRT) provenant de l'hypothalamus latéral (Mikkelsen *et al.*, 2001).

De plus, il existe une innervation parasympathique de la glande pinéale qui provient des ganglions palatins et otiques (Shiotani *et al.*, 1986 ; Moller & Liu, 1999), qui est à l'origine de la libération de l'acétylcholine (Ach) dans la glande (Eranko *et al.*, 1970).

L'ensemble de l'innervation non sympathique décrite n'aurait qu'un rôle limité dans la régulation de la sécrétion de mélatonine, comme dans le contrôle du fonctionnement métabolique de la glande, du moins dans l'état de nos connaissances actuelles.



**Figure.5 :** Biosynthèse de la mélatonine

## **2.3. Biosynthèse de la mélatonine**

### **2.3.1. Étapes de la biosynthèse**

La mélatonine a été identifiée pour la première fois dans la pinéale de bœuf par Lerner et Coll. en 1960, mais sa biosynthèse (**Figure 5**) n'a été effectuée que plus tard, en 1974 par Axelrod. La première étape de sa biosynthèse consiste en la capture du tryptophane (Trp) circulant par les pinéalocytes (Wurtman & Anton-Tay, 1969), permettant ainsi la production de 5-hydroxy-tryptophane (5HTP) par la tryptophane hydroxylase mitochondriale. La décarboxylase des acides aminés aromatiques transforme ensuite le 5HTP en 5-hydroxytryptamine (5HT ou sérotonine) synthétisée en permanence par la glande pinéale, mais sécrétée avec un pic de jour (Sun *et al.*, 2003) par un mécanisme indépendant de la dépolarisation (Walker & Aloyo, 1987). Si l'on considère la glande pinéale, la sérotonine n'est pas un neurotransmetteur, mais simplement un intermédiaire métabolique. La 5HT est ensuite convertie en N-acétylsérotonine (NAS) par l'arylalkylamine N-acétyltransférase (AA-NAT), l'enzyme limitante de la biosynthèse de la mélatonine. Enfin, la NAS est O-méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyle transférase (HIOMT) pour donner la mélatonine qui est directement libérée après sa synthèse, puisque sa structure lipophile lui permet de traverser librement les membranes cellulaires.

### **2.3.2. Régulation de la biosynthèse**

L'AA-NAT est l'enzyme limitante de la biosynthèse rythmique de la mélatonine, le rythme circadien de sécrétion de la mélatonine est en effet directement dépendant du rythme de l'activité de l'AA-NAT (Klein & Weller, 1970). Toutefois, des variations de l'activité de l'HIOMT ont été décrites aussi chez le rat mais l'incidence de ces variations sur la sécrétion de mélatonine reste mineure (Ribelayga *et al.*, 1997).

La NE est le principal neurotransmetteur issu de la projection des SCG sur la glande pinéale, son profil de libération nocturne est corrélé avec celui de la sécrétion de la mélatonine (Drijfhout *et al.*, 1996). La NE agit sur les récepteurs  $\beta_1$  des pinéalocytes, ces récepteurs à sept domaines transmembranaires sont couplés à une protéine  $G_s$  qui active l'adénylate cyclase augmentant ainsi le taux cytosolique d'AMP<sub>c</sub>, ce qui va activer la protéine kinase A (PKA). Cette kinase phosphoryle le facteur de transcription CREB qui se fixera sur le site CRE du promoteur de l'*Aa-nat* permettant la transcription de ce gène (Roseboom &

Klein, 1995 ; Baler et al., 1997). Parallèlement, l'augmentation du taux d'AMP<sub>c</sub> permet aussi une augmentation de l'activité de l'AA-NAT (voir Klein, 1985 pour revue).

La fixation de la NE sur son récepteur  $\alpha_1$  permet la potentialisation de son effet sur le récepteur  $\beta_1$  par des mécanismes impliquant le calcium intracellulaire et la protéine kinase C (PKC) augmentant ainsi l'activité de l'adénylate cyclase et par conséquent les taux d'AMP<sub>c</sub> (Berg & Klein, 1972 ; Sugden & Klein, 1985).

L'arrêt de la libération de NE, en fin de nuit (Drijfhout *et al.*, 1996), engendre une diminution des taux d'AMP<sub>c</sub> (Klein *et al.*, 1978) dans les pinéaloctes. Cette diminution inhibe la protection de l'AA-NAT par la PKA et rend possible sa dégradation par le protéasome. De plus, la déphosphorylation de CREB résultant de l'arrêt de la libération de la NE va arrêter la néotranscription de l'*Aa-nat* (Maronde *et al.*, 1999). Enfin, la phosphorylation de CREB qui induit la transcription de *Aa-nat* induit également la transcription d'*Icer* qui s'accumule pendant la nuit. ICER, présent en fin de nuit en grandes quantités, va entrer en compétition avec Phospho-CREB pour se fixer sur le site CRE de l'*Aa-nat* et participer ainsi à l'arrêt de la transcription de l'*Aa-nat* en fin de nuit (Voir Stehle *et al.*, 2001 pour revue).

### **2.3.3. Catabolisme**

La mélatonine est catabolisée majoritairement par le foie et les reins, elle est hydroxylée en 6-hydroxy-mélatonine (Yu *et al.*, 1993). Ce catabolisme est rapide, puisque la mélatonine a une demi-vie de 20 à 30 minutes dans le sang. La 6-hydroxy-mélatonine est ensuite excrétée sous forme sulphatée ou glucuronée. La forme sulphatée : la 6-sulphatoxy-mélatonine mesurée dans l'urine, aussi bien de l'Homme que du rongeur, est un excellent marqueur de la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale et constitue donc une bonne méthode non-invasive pour évaluer la sécrétion de mélatonine, tant du point qualitatif, que quantitatif (voir Rajaratnam & Arendt, 2001 pour revue). Dans le cerveau, la mélatonine est métabolisée sous forme de N-Acétyl-5-méthoxykénurénamine (Hirata *et al.*, 1974).

## **2.4. Contrôle saisonnier**

La mélatonine est sécrétée au cours de la nuit, mais comme la durée relative de la nuit change au cours de l'année, il en résulte des variations de la durée de la sécrétion de



mélatonine (pour le rat, voir Illnerova *et al.*, 1986 ; Ribelayga *et al.*, 1999). Ces variations sont une conséquence directe de l'intégration de la photopériode par les SCN (voir § 1.5) qui assurent le contrôle exclusif de la sécrétion de cette hormone (Klein & Moore, 1979). L'intégration de la photopériode par les SCN a deux conséquences sur la sécrétion de mélatonine, d'une part, une augmentation de la durée de sa sécrétion avec la durée de la nuit, et d'autre part, le moment d'apparition du pic au cours de la nuit : plus la nuit est longue, plus le pic de mélatonine apparaît tardivement. Ainsi la sécrétion de mélatonine constitue non seulement un message nycthéral pour l'organisme, mais aussi un message saisonnier. De plus, chez certaines espèces telles que le hamster d'Europe ou le hamster sibérien, en photopériode courte, une augmentation de l'amplitude du pic de sécrétion s'ajoute à l'augmentation de sa durée (Vivien-Roels, 1999).

## **2.5. Effets physiologiques**

### **2.5.1. Récepteurs de la mélatonine**

La caractérisation et la localisation des récepteurs de la mélatonine ont donné lieu à de nombreuses études. Deux sous-types de récepteurs principaux ont été clonés MT1 et MT2 (Reppert *et al.*, 1995 ; Masana & Dubocovich, 2001). Ces récepteurs sont à haute affinité et leur constante de dissociation est inférieure à 200 pM. Ils ont sept domaines transmembranaires couplés à une protéine Gi (inhibitrice de l'adénylate cyclase). Des sites de liaison à faible affinité pour la mélatonine ont aussi été décrits, ils ont une constante de dissociation comprise entre 1 et 10 nM (Duncan *et al.*, 1988) et ont été nommés MT3. Le clonage de ce récepteur MT3 a mis en évidence qu'il s'agit en fait d'une enzyme impliquée dans la détoxification : la quinone réductase 2 (Nosjean *et al.*, 2000). La présence des récepteurs MT1 et MT2 a été décrite dans plus de 100 structures cérébrales et 30 structures périphériques, mais le nombre et la nature des structures concernées varient considérablement d'une espèce à l'autre. Toutefois, les SCN ainsi que le lobe tubéral de l'adénohypophyse (*pars tuberalis*) sont deux structures où les récepteurs à haute affinité de la mélatonine sont retrouvés chez quasiment toutes les espèces. Ceci suggère que la mélatonine pourrait rétroagir sur l'horloge et moduler à la fois les systèmes circadiens et saisonniers.

### **2.5.2. Action de la mélatonine sur l'horloge**

Les récepteurs MT1 et MT2 sont présents dans les SCN. Chez la souris, la suppression des gènes de ces récepteurs, par la technologie du KO associée à des techniques

de pharmacologie, a permis d'associer le récepteur MT1 à la suppression de l'activité électrique des SCN en réponse à l'application de mélatonine. Les récepteurs MT2 seraient associés aux décalages de phases obtenus après l'application de la mélatonine (Liu *et al.*, 1997). La mélatonine appliquée à la transition jour/ nuit induisant des avances de phase de l'activité électrique des SCN *in vitro* (Shibata *et al.*, 1989 ; Stehle *et al.*, 1989 ; Mc Arthur *et al.*, 1991) met en évidence son action directe sur l'horloge. Cependant, d'un point de vue moléculaire, son action sur les SCN n'est pas encore bien élucidée, car l'application de mélatonine n'est suivie d'aucun effet sur les gènes horloge *Per*, *Cry*, *Bmal* ou *Clock* (Poirel *et al.*, 2003), toutefois des résultats récents montrent une effet sur *Rev-erb  $\alpha$*  dans les SCN (Agez *et al.*, communication personnelle).

### **2.5.3. Action de la mélatonine sur la *pars tuberalis***

Les récepteurs MT1 sont fortement présents dans la *pars tuberalis*. Grâce à ces récepteurs, la mélatonine induit la sécrétion saisonnière de prolactine par les cellules lactotropes de la *pars distalis* (Williams & Morgan, 1988 ; de Reviere *et al.*, 1989 ; Lincoln & Clarke, 1994). Si le signal émanant de la *pars tuberalis* vers la *pars distalis* n'a pas encore été déterminé, il est cependant d'ores et déjà nommé : la tubéraline. Par ailleurs, l'application de mélatonine engendre l'induction des gènes *Per1* et *Cry1* dans la *pars tuberalis* (Dardente *et al.*, 2003 ; Lincoln *et al.*, 2003). Chez les souris KO pour le récepteur MT1, l'expression rythmique de ces gènes a totalement disparu (von Gall *et al.*, 2005). Cette structure n'aurait donc pas de propriétés oscillantes propres mais serait directement, et exclusivement, dépendante de la sécrétion de mélatonine.

### **2.5.4. Mélatonine et reproduction**

Outre ses effets sur la *pars tuberalis* et les SCN, la mélatonine affecte principalement la reproduction. Les effets de la suppression de mélatonine par pinéalectomie ou de son augmentation par des injections à durée variable ont été étudiés sur la reproduction (Voir Reiter, 1980 ; Pévet, 1998 pour revue). Le hamster syrien a sa période de reproduction en photopériode longue, mais si au cours de cette période, de la mélatonine lui est infusée pour mimer une durée de nuit longue, il va présenter alors une régression testiculaire comme s'il avait été placé en photopériode courte (Gauer *et al.*, 1994). Chez les animaux pinéalectomisés, il n'y a plus de variations saisonnières de leur activité sexuelle. Chez le hamster syrien, il semble que les effets décrits sur la reproduction passent par l'hypothalamus

dorsomédian. En effet la lésion de cette structure contenant des récepteurs de la mélatonine, bloque la régression testiculaire induite par la photopériode courte ou par l'application de mélatonine. En revanche, la lésion de l'hypothalamus ventromédian induit une réactivation plus rapide de l'activité sexuelle lorsque les animaux sont placés en photopériode longue (Maywood & Hastings, 1995 ; Maywood *et al.*, 1996 ; Bae *et al.*, 1999 ; Malpaux *et al.*, 2001). Ainsi ces structures constitueraient les sites d'action de la mélatonine pour le contrôle de l'activité reproductrice des espèces photopériodiques.

## **2.6. Effets chronobiotiques**

La mélatonine n'est pas impliquée directement dans l'organisation de la rythmicité circadienne. En effet, la pinéalectomie ne modifie, ni la période du rythme d'activité locomotrice (Quay, 1962 ; Cheung & Mc Cormack, 1982), ni l'activité électrique des SCN (Redlin & Lynch, 1997). En revanche, lorsque de la mélatonine est administrée quotidiennement, mais à des doses supraphysiologiques, elle entraîne, à une période de 24 heures, les rythmes à la fois d'activité locomotrice et de prise de boisson (Redman *et al.*, 1983 ; Thomas & Armstrong, 1988 ; Cassone, 1990 ; Pitrosky *et al.*, 1999). C'est sa capacité à entraîner les rythmes circadiens qui a permis d'attribuer le qualificatif de chronobiotique à la mélatonine (voir Pévet *et al.*, 2002 pour revue). Cette capacité d'entraînement par la mélatonine est la somme des avances de phases induites par ses applications répétées, celles-ci n'étant efficaces pour la synchronisation qu'à un créneau horaire précis : à la transition jour/nuit (ZT12) en LD ou au début de la période d'activité locomotrice lorsque les animaux sont placés en DD (CT12). Ces avances de phases sont observables sur l'activité locomotrice (Armstrong & Chesworth, 1987), ainsi que sur la sécrétion de mélatonine endogène (Bothorel *et al.*, 2002). De plus, lorsque la mélatonine est infusée à un autre créneau horaire, l'activité locomotrice continue son libre cours jusqu'à ce que l'application de la mélatonine coïncide avec le début de l'activité locomotrice, et les animaux sont alors synchronisés à 24 heures (Redman *et al.*, 1983 ; Cassone & Natesan, 1997, Pitrosky *et al.*, 1999 ; Schuhler *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que ce créneau efficace pour l'entraînement, correspond à celui pour lequel l'application de mélatonine sur les SCN *in vitro* induit une avance de phase de leur activité électrique (Shibata *et al.*, 1989 ; Stehle *et al.*, 1989 ; Mc Arthur *et al.*, 1991). Chez l'humain, les propriétés de resynchronisation de la mélatonine sont utilisées pour traiter les troubles relatifs à une désorganisation temporelle, c'est le cas chez certains aveugles, chez des

travailleurs postés, ou encore lors de vols transméridiens (voir Claustrat *et al.*, 1996 ; Arendt *et al.*, 1997 pour revue).

## **2.7. Effet pharmacologique de la mélatonine exogène sur la mélatonine endogène**

L'application de mélatonine exogène à la transition jour/nuit (ZT12) a un effet synchroniseur sur les rythmes circadiens. Cette synchronisation est le résultat d'un effet sur les SCN. La sécrétion de mélatonine endogène par la glande pinéale, sortie de l'horloge par excellence, doit par conséquent être entraînée aussi par la mélatonine exogène. L'application ponctuelle de mélatonine à ZT 12 induisant une avance de phase de l'activité électrique des SCN, ainsi qu'une avance de phase de l'activité locomotrice (voir § précédent) résulte aussi en une avance de phase de l'activité de l'AA-NAT (Humlova & Illnerova, 1992) et également de la sécrétion endogène de mélatonine (Bothorel *et al.*, 2002).

L'application ponctuelle de mélatonine chez le rat induit une augmentation durable de l'amplitude de la sécrétion de la mélatonine endogène. Ceci résulte de l'effet de la mélatonine exogène sur l'horloge même. L'augmentation d'amplitude obtenue est équivalente, que la mélatonine exogène soit appliquée de façon systémique, ou directement sur les SCN. Par ailleurs, il convient d'exclure un effet local de la mélatonine exogène sur la glande pinéale puisque son application directe dans cette glande, n'a aucun effet sur la sécrétion de mélatonine endogène. De plus, comme pour les avances de phase ou l'entraînement, la fenêtre de sensibilité du système à la mélatonine est la même : seule une application à la transition jour/nuit (ZT12) est efficace pour obtenir une augmentation de l'amplitude de sécrétion de la mélatonine (Bothorel *et al.*, 2002). Cet effet sur l'amplitude est certainement attribuable à une augmentation dans la glande pinéale de la libération de NE par les SCG. Il a été montré que l'application de mélatonine entraîne une augmentation de la quantité de NE présente dans la glande pinéale (Pazo *et al.*, 2002). L'augmentation d'amplitude de la sécrétion de mélatonine décrite chez le rat a été également observée chez l'Homme (Zaidan *et al.*, 1994).

Ces effets de la mélatonine appliquée à ZT12 sur l'horloge circadienne, supposent deux possibilités d'action, soit la mélatonine affecte globalement l'amplitude des oscillations de l'horloge, soit elle n'agit que localement sur une partie de l'horloge contrôlant spécifiquement la sécrétion de mélatonine endogène.

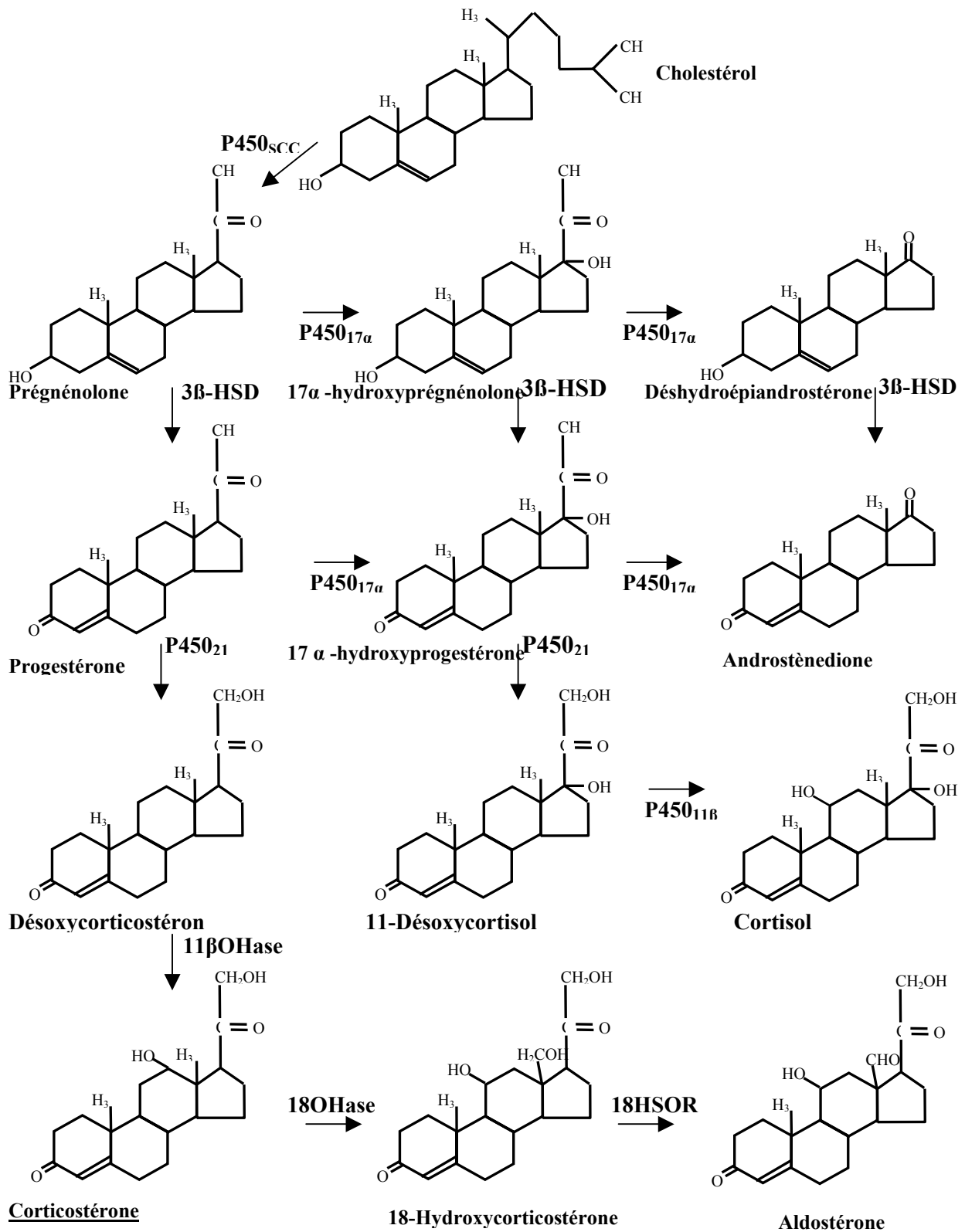
### **3. Sécrétion rythmique de corticostérone**

#### **3.1. Généralités**

La CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) est synthétisée dans les neurones parvocellulaires des noyaux paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus, et libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Cette libération induit dans l'hypophyse antérieure la synthèse de l'hormone adrénocorticotrope ACTH (Adreno-CorticoTropin Hormone), puis sa sécrétion dans la circulation générale. L'ACTH ainsi libérée, stimule la synthèse et la libération de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien. Selon les espèces, la stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien se traduit par la production principale de corticostérone (rat ou *Arvicanthis*), de cortisol (Homme ou hamster syrien), ou d'un mélange des deux hormones (hamster sibérien). Outre le contrôle humoral de la sécrétion des glucocorticoïdes *via* l'ACTH, il existe en parallèle un contrôle nerveux de cette sécrétion par le système sympathique (Jasper & Engeland, 1994).

#### **3.2. Régulation nerveuse sympathique de la glande surrénale : importance du nerf splanchnique**

Le nerf splanchnique n'innervent pas directement la corticosurrénale, mais la médullosurrénale. Cette innervation module l'induction de la stéroïdogénèse induite par l'ACTH. La stimulation sympathique de la médullosurrénale a plusieurs conséquences. La première est l'induction d'une synthèse médullosurrénalienne de CRH et d'ACTH. Cette ACTH s'ajoute à l'ACTH circulante d'origine hypophysaire et augmente ainsi la quantité d'ACTH qui pourra se fixer sur les récepteurs de la corticosurrénale. La deuxième conséquence est une activation des neurones post-ganglionnaires présents dans la médullosurrénale, qui vont libérer des catécholamines agissant sur les cellules de la corticosurrénale augmentant ainsi la biosynthèse de glucocorticoïdes.



**Figure 6 : Biosynthèse des corticostéroïdes**

La troisième conséquence est l'induction de la libération de différents neuropeptides par la médullosurrénale (voir Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998 pour revue). Ces neuropeptides sont très nombreux, et chez le rat on trouve le VIP, la galanine, l'AVP, l'OT, le NPY, la Substance P (SP), le PACAP et la somatostatine. Parmi eux, le VIP présente un grand intérêt, en raison de son effet vasodilatateur et son application dans la glande mime l'effet de la stimulation du nerf splanchnique connue pour induire une augmentation du débit sanguin. L'effet vasodilatateur du VIP s'ajoute à celui du CRH produit localement. Il en résulte une augmentation considérable du débit sanguin dans la glande surrénale, permettant ainsi une entrée plus massive d'ACTH hypophysaire dans la corticosurrénale qui augmente alors sa stéroïdogénèse. Le contrôle nerveux de la production de corticostérone est donc primordial dans l'établissement de son rythme de sécrétion, par le biais à la fois de la vasodilatation et de la production locale d'ACTH par la médullosurrénale.

### **3.3. Biosynthèse et biodisponibilité**

La synthèse des glucocorticoïdes comprend plusieurs étapes avec de nombreux métabolites intermédiaires (**Figure 6**). Le substrat initial est le cholestérol dont l'entrée dans la matrice interne de la mitochondrie est stimulée par l'ACTH. L'étape limitante dans la voie de synthèse est la conversion du cholestérol en prégnénolone, réaction catalysée par une enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol, la P<sub>450scc</sub> (P<sub>450</sub> side chain clivage), cette enzyme est située au niveau de la matrice mitochondriale interne. La plupart des enzymes de cette voie de synthèse appartiennent à la super-famille du cytochrome P<sub>450</sub>. Un second élément limitant de cette biosynthèse est la mobilisation du cholestérol et sa présentation au P<sub>450scc</sub>. Une fois synthétisés, les glucocorticoïdes sont rapidement sécrétés car la capacité de stockage de la glande est minime.

Les glucocorticoïdes (corticostérone ou cortisol) existent sous deux formes dans le sang : une forme libre (10 %) et une forme liée à la transcortine (ou CBG : Corticosteroid Binding Globulin) ou à l'albumine (90 %). Seule la forme libre est biologiquement active. La transcortine et l'albumine, protéines de la famille des globulines, auraient un rôle de tampon afin d'éviter des variations trop brutales des concentrations de glucocorticoïdes.

### **3.4. Catabolisme**

La corticostérone a une demi-vie de 80 à 120 minutes, en raison de son inactivation rapide par le foie qui la rend hydrosoluble. Les métabolites ainsi produits seront excrétés. Au niveau rénal, 90 % de la corticostérone est éliminée sous forme hydrosoluble et les 10 % restants de la corticostérone sont éliminés sous sa forme intacte dans les urines.

### **3.5. Effets physiologiques**

#### **3.5.1. Récepteurs**

Il existe deux types de récepteurs, les MR (*Mineralocorticoid Receptors*) et les GR (*Glucocorticoid Receptors*). Les récepteurs MR ont une forte affinité pour la corticostérone, leur constante de dissociation est de 0,5 nM et ils sont saturés tout au long du nycthémère, que la concentration de corticostérone soit maximale ou à son niveau de base. Les récepteurs GR ont une affinité dix fois plus faible pour la corticostérone, leur constante de dissociation est de 5 nM et ils sont très peu liés à la corticostérone lorsque celle-ci est à son niveau basal, mais leur taux de liaison dépasse les 50 % lorsque les valeurs maximales du pic circadien de libération de corticostérone sont atteintes ou encore lors de situations de stress. Ces deux récepteurs appartiennent à la super-famille des récepteurs hormonaux nucléaires, ils sont présents dans le cytoplasme et donc facilement accessibles aux hormones stéroïdiennes qui, en raison de leur nature lipidique, traversent facilement les membranes cellulaires. Une fois que la corticostérone est fixée sur ces récepteurs, ceux-ci sont alors transloqués dans le noyau mais à condition que les récepteurs se dimérisent, et il s'agit en général d'homodimérisation. Dans le noyau, les dimères formés vont se fixer sur des séquences GRE (*glucocorticoid responsive element*) des promoteurs de différents gènes, avec pour résultat, soit une activation, soit une inhibition de la transcription du gène, ceci en fonction de la nature du GRE qui peut être positif (GRE) ou négatif (nGRE). Comme les MR sont toujours saturés, ce sont les récepteurs GR dont le taux de liaison varie au cours de la journée, qui sont sensibles à la sécrétion rythmique de la corticostérone et sont donc responsables de ses effets physiologiques. Au niveau périphérique, les GR sont plus particulièrement présents dans le foie et dans l'hypophyse. En ce qui concerne le système nerveux central, les GR sont présents de façon ubiquitaire (voir De Kloët *et al.*, 1998 pour revue), mais les SCN font figure d'exception dans la mesure où les GR ne sont quasiment pas présents dans cette structure, siège de l'horloge circadienne (Fuxe *et al.*, 1985). D'ailleurs, l'application d'un analogue de



la corticostérone, le dexaméthasone, affecte l'expression des gènes horloge dans les tissus périphériques mais n'a aucun effet dans les SCN (Balsalobre *et al.*, 2000).

### **3.5.2. Effets métaboliques**

La corticostérone est une hormone hyperglycémisante, cette propriété lui est conférée par les différentes cibles que sont les muscles, la peau et les tissus lymphoïdes, adipeux et conjonctifs. Dans le foie, la corticostérone induit d'une part, la néoglucogénèse à partir des acides gras et du glycérol circulants, et d'autre part, le stockage du glucose sous forme de glycogène. Ces phénomènes conjugués aboutissent à la constitution d'un stock important de glucose mobilisable rapidement. Sur les tissus lymphoïdes, conjonctifs et adipeux, la corticostérone a un effet catabolisant, dans la mesure où ces tissus vont diminuer leur consommation de glucose. Sur le muscle, cet effet est atténué (Cahill, 1971). Par ailleurs, la corticostérone stimule la lipolyse dans le tissu adipeux permettant ainsi une libération importante de glycérol et d'acides gras dans le sang. Cette augmentation du taux sanguin de glycérol permet d'obtenir une plus grande quantité de substrat disponible pour la néoglucogénèse hépatique. Quant aux acides gras libérés, ils constituent une ressource énergétique alternative au glucose, qui est essentielle pour le muscle. La corticostérone induit également une libération d'acides aminés à la fois par le muscle et les tissus lymphoïdes et conjonctifs, mais en parallèle elle diminue de façon drastique la synthèse protéique dans ces structures. Ces acides aminés, et ceux non utilisés pour la synthèse protéique, permettent à nouveau d'alimenter la néoglucogénèse. La corticostérone en tant qu'hormone préparant l'organisme à l'effort, agit par le biais de ses effets métaboliques, en mobilisant de grandes quantités de glucose provenant des diverses sources énumérées.

### **3.5.3. Effets immunitaires**

Les glucocorticoïdes induisent globalement une inhibition des réponses immunitaires et inflammatoires. Ils modulent l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée, et en ce qui concerne l'immunité à réponse adaptative, ils inhibent l'immunité cellulaire et favorisent l'immunité humorale en modifiant le ratio lymphocyte Th1 / lymphocyte Th2 (voir Franchimont, 2004 pour revue). Ces effets des glucocorticoïdes sont à l'origine des profils circadiens des réponses immunitaires observées (avec prédominance des réponses cellulaires durant le jour subjectif et des réponses humorales durant la nuit subjective). Ces variations immunitaires sont également observées lors des élévations brutales

des concentrations plasmatiques en glucocorticoïdes dans des situations de stress (voir Chrousos & Gold, 1992 pour revue).

#### **3.5.4. Autres effets physiologiques**

Les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur la fonction sexuelle et en particulier, sur les neurones à GnRH, les cellules gonadotropes hypophysaires et les gonades. D'un point de vue circulatoire, la volémie et le cœur semblent être affectés par les glucocorticoïdes qui favorisent à la fois une diminution de la volémie par augmentation d'excrétion d'eau et une augmentation de la force de contraction cardiaque. Enfin, les glucocorticoïdes sont des euphorisants et stimulent l'appétit.

## **B. Objectifs**

Chez l'animal, l'activité locomotrice est la sortie de l'horloge la plus étudiée. Cette sortie comportementale a servi d'outil pour appréhender l'horloge circadienne des Mammifères. Des travaux portant sur les effets de lésions et de greffes de SCN utilisent l'activité locomotrice comme unique sortie de l'horloge. Il en est de même pour l'étude des courbes de réponse de phase (§1.4) ou d'entraînement. En revanche, il y a peu de travaux portant sur plusieurs sorties de l'horloge étudiées en parallèle. Pour appréhender finement le fonctionnement de l'horloge circadienne, ainsi que le mode de contrôle qu'elle exerce sur l'organisme en général, il est intéressant d'étudier différentes sorties de cette horloge en même temps, et si possible, sur les mêmes animaux. Pour cela, il existe deux approches possibles, soit laisser l'horloge fonctionner dans des conditions physiologiques normales, soit en modifier le fonctionnement en changeant différents paramètres. La première approche ne présente pas un grand intérêt, car les résultats ne représenteraient que la somme de toutes les sorties, déjà décrites séparément dans la littérature. C'est pourquoi dans ce travail, nous avons choisi de modifier le fonctionnement de l'horloge par deux moyens différents, d'une part, l'application de mélatonine exogène en tant qu'outil pharmacologique, et d'autre part, la modification de la durée de la photopériode. A la suite de ces traitements, nous avons suivi l'évolution simultanée des caractéristiques de différentes sorties de l'horloge (profils de sécrétion de deux hormones, la mélatonine et la corticostérone et profil de l'activité locomotrice).

### **1. L'effet pharmacologique de la mélatonine sur l'horloge est-il global ?**

La mélatonine exogène est un outil pharmacologique puissant, connu pour agir sur l'horloge. Si cette hormone est appliquée de manière répétitive à la transition jour/nuit, elle est capable d'entraîner les rythmes circadiens grâce à son action sur les SCN chez l'animal maintenu en obscurité constante et présentant donc un libre-cours (Voir §2.7). De même, une application ponctuelle de mélatonine à ZT12 (début de la nuit) ou à CT12 (début de l'activité locomotrice en DD) provoque une avance de phase des rythmes d'activité électrique des SCN, d'activité locomotrice et de sécrétion endogène de mélatonine. Elle induit également une augmentation importante et durable de l'amplitude du rythme de sécrétion endogène de mélatonine (Voir §2.8). Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la mélatonine exogène peut

augmenter globalement l'amplitude des oscillations de l'horloge, nous allons suivre simultanément par microdialyse intracérébrale chez des rats, les sécrétions endogènes de mélatonine et de corticostérone, avant et après une injection de mélatonine exogène à la transition jour/nuit.

## **2. La corticostérone, une autre sortie endocrine saisonnière de l'horloge ?**

Si l'application de mélatonine exogène est un bon moyen pour modifier le fonctionnement de l'horloge circadienne, la variation de la photopériode en est un autre. Les changements de la durée relative de la phase éclairée du nyctémère existent dans les conditions naturelles. Dans le cas d'une photopériode courte (nuit longue), la durée de la sécrétion de mélatonine augmente et l'apparition du pic de mélatonine est retardée par rapport au début de la nuit. Ces variations pour la mélatonine sont dues à l'intégration de la photopériode par l'horloge circadienne (voir §1.5). En ce qui concerne la sécrétion de corticostérone, on peut se demander si c'est une autre sortie endocrine saisonnière de l'horloge. En d'autres termes, ceci revient à savoir si l'horloge intègre de façon globale les variations photopériodiques, et si la distribution d'une telle intégration est équivalente pour chaque sortie. Par ailleurs, une autre sortie de l'horloge sera prise en compte, à savoir l'activité locomotrice. L'association de cette sortie comportementale aux deux sorties endocrines que sont les sécrétions de mélatonine et de corticostérone, représente une approche physiologique dans la problématique de l'intégration de la photopériode par les SCN qui est complémentaire des approches moléculaires ou électrophysiologiques déjà effectuées dans ce domaine (voir §1.5). Cette étude sera effectuée chez un animal nocturne (le rat) et chez un animal diurne (*Arvicanthis*). Chez ces deux espèces, les profils de corticostérone et d'activité présentent des phases complètement différentes (nocturnes ou diurnes, mono- ou bi-phasiques), tout en ayant tous les deux des profils nocturnes de mélatonine.

## **C. Matériel et Méthodes**

### **1. Animaux**

Des rats ou des Arvicantis mâles ont été utilisés pour les expériences. Leurs caractéristiques (poids, provenance...) et leurs conditions d'élevage (régime alimentaire et éclairage) seront décrites dans la partie D.

### **2. Microdialyse**

L'étude du contenu en neurotransmetteurs de différentes structures cérébrales a largement utilisé des explants après sacrifice des animaux, mais cette méthode n'est pas très puissante dans la mesure où les neurotransmetteurs sont dégradés, métabolisés ou recapturés très rapidement par le tissu et elle ne reflète donc pas la neurotransmission *in vivo*. Une autre méthode a porté sur la neurotransmission *in vivo* en étudiant la concentration de neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire qui est le reflet de la neurotransmission synaptique. Les premières mesures effectuées pour le liquide extracellulaire ont été obtenues par la technique du « push pull ». Cette technique, particulièrement lourde, n'a été que très peu utilisée en neurosciences. Par la suite, la voltamétrie et la microdialyse *in vivo* ont été largement développées afin de mesurer les différents composants du liquide extracellulaire (Kissinger *et al.*, 1973). L'idée d'utiliser le principe de la dialyse pour approcher la composition du liquide extracellulaire date de presque une quarantaine d'années (Bito *et al.*, 1966 ; Delgado *et al.*, 1972). Mais ce n'est que plus récemment et grâce au développement de petites fibres de dialyse, que la microdialyse est devenue un outil puissant permettant de mesurer de nombreux composés du liquide extracellulaire *in vivo* (voir Benveniste, 1989 ; Justice, 1993 pour revue).

#### **2.1. Principe et propriétés de la microdialyse**

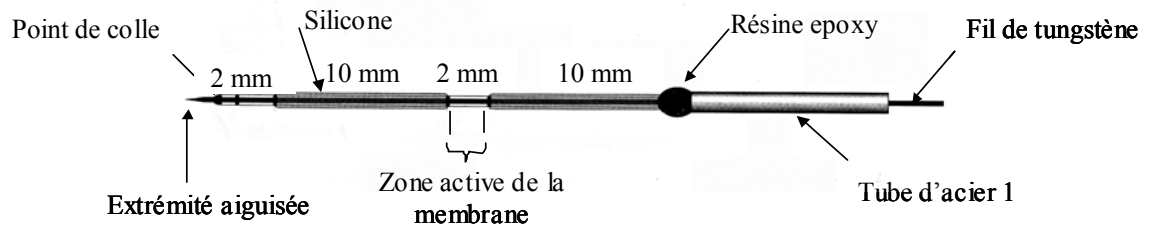
##### **2.1.1. Principe de la microdialyse**

La technique consiste à perfuser une membrane de dialyse tubulaire, introduite dans une région cérébrale d'intérêt, avec un liquide isoosmotique s'équilibrant avec le liquide extracellulaire dans l'espace intercellulaire (sans échange de liquide) et à récolter des dialysats pour y détecter la présence de neurotransmetteurs (ou autres molécules diffusibles) libérés par des terminaisons nerveuses dans cet espace.

La paroi interne de la membrane de dialyse est en contact avec le liquide de perfusion et la paroi externe est en contact avec le liquide extracellulaire, et donc avec les neurotransmetteurs libérés. Le transport de ces derniers entre les deux compartiments est seulement dû à un phénomène de diffusion passive, suivant simplement le gradient de concentration. Ainsi un transmetteur présent dans le liquide extracellulaire mais absent du liquide de perfusion, va entrer dans ce dernier en traversant la membrane de dialyse. Les caractéristiques de la membrane ont leur importance selon le neurotransmetteur étudié. La membrane de dialyse peut également être utilisée pour infuser des molécules dans des zones cérébrales et dans ce cas, c'est une microdialyse inverse.

### 2.1.2. Propriétés de la microdialyse

- **La membrane de dialyse ne permet pas le passage de grosses molécules** par diffusion. Seules les petites molécules peuvent traverser la membrane, tels que les neurotransmetteurs, et elles ne sont pas métabolisées par des enzymes, trop grosses pour traverser la membrane. Le fait que les dialysats ne contiennent aucune grosse molécule, permet de les analyser directement après leur collecte sans aucune étape de purification (filtration, chromatographie...) qui réduirait encore le volume de l'échantillon.
- Les mesures faites sur les dialysats portent sur la composition du **liquide extracellulaire**, ce qui permet ainsi de différencier les études effectuées par microdialyse de celles effectuées sur des tissus entiers *post mortem*.
- La microdialyse présente l'avantage d'être utilisable dans **quasiment tous les tissus**, et en plus chez des **animaux vigiles et libres de leurs mouvements**.
- **L'échantillonnage peut s'étaler sur une longue durée** (jusqu'à plusieurs jours), permettant ainsi un très grand nombre d'échantillons pour un même animal, ce qui réduit de façon non négligeable le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérience.
- Cette technique permet à la fois de collecter et d'administrer des substances, ces deux actions pouvant parfois être menées de front.
- La microdialyse intracérébrale n'induit que des dommages très minimes à la barrière hématoencéphalique, et celle-ci est rétablie dans les deux à trois jours suivant l'implantation. Ainsi, passé ce délai, l'animal se trouve dans une situation équivalente aux conditions physiologiques normales.



**Figure 7** : Représentation schématique d'une sonde transversale.

## **2.2. Sonde de microdialyse**

### **2.2.1. Construction de la sonde transversale**

La construction de cette sonde (voir Figure 7) a été mise au point et publiée par Drijfhout et coll. en 1993. La membrane de dialyse utilisée est constituée d'esters saponifiés de cellulose, elle a un diamètre intérieur de 0,22 mm, un diamètre extérieur de 0,27 mm et un "cut off" de 10000 Da (les pores de la membrane ne permettent pas le passage de molécules dont le poids moléculaire excède 10000 Da). A l'intérieur de cette membrane est introduit un fil de tungstène de 0,1 mm de diamètre et de 76,5 mm de long dont une extrémité est appointée pour faciliter la pénétration de la sonde dans le tissu cérébral. Du côté opposé à l'extrémité pointue, un tube d'acier (tube 1 sur le schéma) provenant d'une aiguille de 23G (Terumo) est collé sur la membrane grâce à de la résine époxy (Poxycomet, Loctite). Après séchage de la résine, on définit, à partir du point de résine, 4 parties de membrane mesurant respectivement 10 ; 2 ; 10 et 2 mm. Les deux parties de 10 mm seront enduites de silicone (CAF 3, Rhône-Poulenc, France). Elles sont de part et d'autre d'une partie centrale de 2 mm définie comme étant la partie active de la sonde, et destinée à être implantée dans la glande pinéale. La dernière étape consiste à couper l'excès de membrane, situé au delà de la dernière partie de 2 mm. La membrane est alors fixée au fil de tungstène grâce à un point de colle de polycyanate (501, Loctite).

### **2.2.2. Rendements de la sonde transversale**

#### ***2.2.2.1. Rendements pour la mélatonine***

Afin de déterminer les rendements de la sonde *in vitro*, quatre sondes ont été construites puis collées sur des bouchons de tubes Ependorf. Elles sont ensuite perfusées avec du Ringer (NaCl : 154 mM; KCl : 4 mM; CaCl<sub>2</sub> : 2,25 mM) à un débit de 3µl/min et immergées, pendant une heure, successivement dans des tubes Ependorf contenant des solutions de mélatonine de concentrations croissantes (20 nM, 200 nM, 20 µM et 200 µM). Entre chaque solution de mélatonine, les sondes sont rincées dans du Ringer pendant deux heures. Les concentrations de mélatonine sont ensuite déterminées dans les dialysats récoltés.

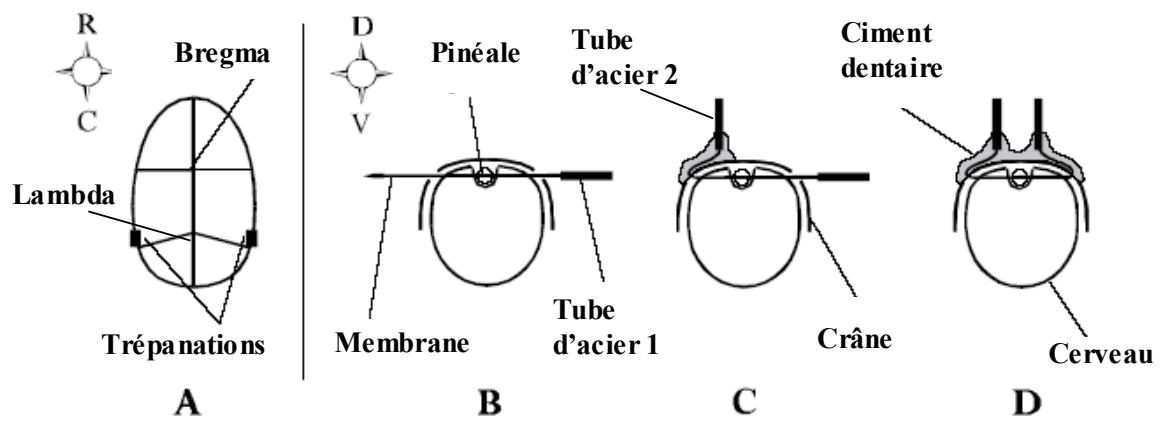
Les sondes ont été immergées dans des solutions contenant des concentrations de mélatonine de 20 nM, 200 nM, 20 µM et 200 µM. Les rendements obtenus, exprimés en %, et



calculés en faisant le rapport entre la concentration de mélatonine des dialysats et celle du bain dans lequel elles sont immergées, sont respectivement de  $1,40 \pm 0,35$  ;  $1,37 \pm 0,51$ ;  $3,72 \pm 0,70$ ; et  $4,65 \pm 1,19$ .

#### ***2.2.2.2. Rendement pour la corticostérone***

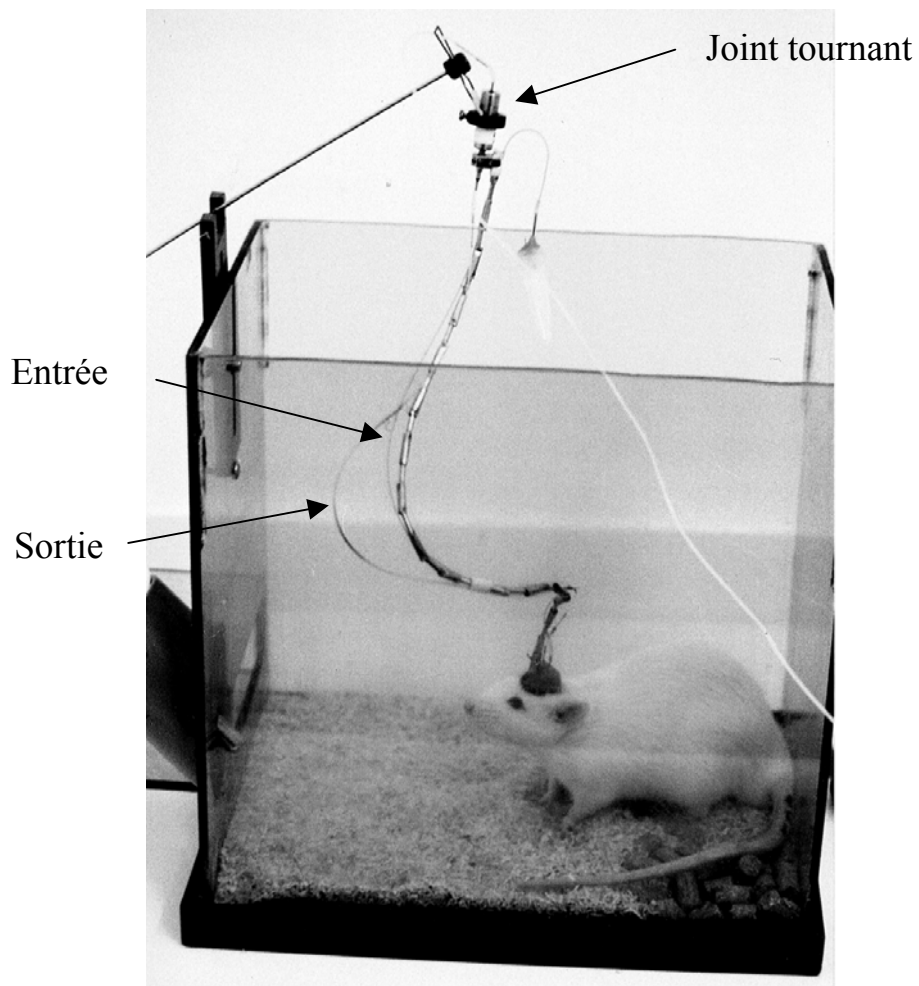
De la même manière que pour la mélatonine, cinq sondes ont été construites et utilisées pour déterminer les rendements avec la corticostérone. Trois solutions de corticostérone ont été utilisées : 0,5 ng/ml, 2,5 ng/ml et 10 ng/ml. Les rendements obtenus pour ces trois concentrations sont respectivement de  $1,66 \pm 0,38$  ;  $2,70 \pm 0,42$  et  $3,18 \pm 0,40$  %.



**Figure 8 :** Représentation schématique des étapes de l'implantation de la sonde de microdialyse transpinéale

### **2.3. Chirurgie**

La technique d'implantation d'une sonde transversale de microdialyse dans la glande pinéale a été mise au point et décrite pour la première fois par Drijfhout et collaborateurs en 1993 (**Figure 8**). Après anesthésie, l'animal est maintenu dans un cadre stéréotaxique. La peau recouvrant la calotte crânienne fait l'objet de trois incisions, une première longitudinale effectuée suivant la ligne médiane sur le crâne et deux autres latérales faites jusqu'au dessus des oreilles. Les muscles temporaux ainsi que la peau sont écartés et maintenus dans une position tendue grâce à des fils. Deux trépanations de 2 mm de diamètre au niveau de la ligne de suture formant le lambda ( $\lambda$ ) sont effectuées dans les os temporaux droit et gauche (A). La sonde de microdialyse maintenue horizontale par une colonne stéréotaxique est introduite latéralement de façon à traverser la glande pinéale située à -1,6 mm par rapport à la surface du crâne et à +0,7 mm antérieurement du  $\lambda$  (B). Quatre vis sont ancrées dans le crâne en arrière du Bregma et de part et d'autre du  $\lambda$  afin de maintenir les tubes de la sonde en place à l'aide de ciment dentaire (Paladur, Kulzer, Les Ulis, France). Après avoir coupé la partie pointue du fil de tungstène au-delà du point de colle, un deuxième tube d'acier (tube 2) est collé sur la membrane à environ 1 mm de la zone siliconée et ensuite le fil de tungstène est retiré. Finalement, ces deux tubes d'acier, constituant l'entrée et la sortie de la sonde, sont fixés au-dessus du crâne dans une position verticale grâce à du ciment dentaire (C et D). Un cylindre d'acier de 8 mm de diamètre et de 15 mm de long est également inclus dans le ciment dentaire. Ce cylindre va constituer le premier maillon d'une chaîne métallique articulée (**Figure 9**) qui servira de support aux cathéters qui seront connectés à la sonde. Après cette intervention chirurgicale, les animaux disposent d'une période de récupération d'au moins trois jours avant la dialyse.



**Figure 9** : Photographie d'un rat appareillé de sa sonde transspinéale ainsi que du système permettant la collecte des dialysats

### **3. Dialyse *in vivo***

L'entrée de la sonde transpinéale est connectée à un cathéter en polyéthylène de 0,38 mm de diamètre intérieur et de 1,09 mm de diamètre extérieur (Folioplast Les Ullis, France). La sortie de la sonde est connectée à un cathéter en polyéthylène de 0,30 mm de diamètre intérieur et de 0,70 mm de diamètre extérieur (Folioplast Les Ullis, France). Ce cathéter de sortie est connecté à un tube de collecte de 1,5 ml en polypropylène (Sarstedt, Orsay, France), qui sert à recueillir les dialysats. Le jour précédant l'expérimentation, les animaux sont connectés au système de microdialyse (comprenant un joint tournant, une chaîne supportant les cathéters et le tube de collecte des dialysats) qui est placé à l'extrémité d'un balancier fixé sur la cage et équipé d'un contre-poids à l'autre extrémité (**Figure 9**). Ce système permet de collecter les dialysats sans avoir à manipuler les animaux qui restent ainsi libres de leurs mouvements. L'entrée de la sonde est connectée à une pompe (Pump 22, Harvard, Biosciences, Les Ullis, France) *via* un joint tournant (375/22, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA). Pendant la microdialyse, la sonde est perfusée par du Ringer avec un débit de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  pour les rats ou à 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  pour les Arvicanthis. Les dialysats sont récoltés de manière horaire. Les échantillons obtenus sont immédiatement stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en attente de leur dosage.

## **4. Activité locomotrice**

### **4.1. Activité générale**

L'activité locomotrice générale est mesurée par télémétrie. Un émetteur (Mini-mitter Co. Sun River OR), placé chirurgicalement dans la cavité abdominale des animaux transmet, par des ondes herziennes, les mouvements de l'animal à une antenne placée sous la cage et connectée à un ordinateur qui enregistre régulièrement (toutes les 10 minutes et 24h/24h) ces informations grâce à un logiciel d'acquisition (Dataquest III, Mini-mitter Co. Sun River OR.). L'activité générale est ainsi mesurée en unités arbitraires et représentée sur un actogramme grâce au logiciel Matlab.

### **4.2. Activité de roue**

Un rongeur placé dans une cage munie d'une roue va y courir durant sa période d'activité. Ainsi, le comptage du nombre de tours de roue est un moyen non-invasif pour

évaluer l'activité locomotrice d'un rongeur. Ainsi, un aimant fixé à la roue établit un contact à chaque tour et un système d'acquisition (Dataquest III, Mini-mitter Inc.) enregistre ces données toutes les 5 minutes, 24 heures sur 24. Ces données sont ensuite quantifiées et retranscrites sous la forme d'actogrammes.

## 5. Dosages radioimmunologiques

Les concentrations en mélatonine et en corticostérone dans les dialysats 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 soit la fraction libre (dosage de la corticostérone), soit la fraction liée à l'anticorps (dosage de la mélatonine). La radioactivité (de type gamma) est ensuite quantifiée, et en référence à une gamme étalon, les concentrations en mélatonine et en corticostérone, présentes dans les dialysats, sont facilement mesurées.

Pour le dosage de la mélatonine, un anticorps polyclonal de lapin spécifique pour la mélatonine (R 19540 *INRA*, Nouzilly, France) 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.

Pour le dosage de la corticostérone, un kit commercial (ICN Biomedical division Carson, CA, USA) est utilisé et les réactifs sont dilués deux fois afin d'adapter ce dosage aux volumes et concentrations de corticostérone présents dans les dialysats. Ainsi, 50 µl d'anticorps, 25 µl d'échantillon (ou de standard de la gamme étalon) et 50 µl de corticostérone marquée (6000 cpm/50 µl) sont incubés durant au moins une nuit à 4 °C afin d'atteindre l'équilibre de liaison sur l'anticorps. Après cette incubation, du charbon actif est ajouté au milieu. Après centrifugation, le surnageant est aspiré, ce qui permet d'isoler la fraction libre dans le culot. La radioactivité des culots est quantifiée et la concentration de corticostérone déterminée.

## 6. Analyse et traitement des données

Pour l'analyse, ainsi que pour la mise en forme des données, grâce au logiciel Sigma Plot (Jandel Scientific, Erkrath, Germany), un modèle de régression non linéaire a été largement utilisé. Cette régression a été appliquée aussi bien aux profils de sécrétion de mélatonine et de corticostérone, qu'aux profils d'activité locomotrice. Cette régression a pour équation :  $y = y_0 + y_{\text{ampl}} / \{[(S_1 + \exp(\varphi_1 - x))] [1 + \exp(S_2 (x - \varphi_2))]\}$

Où  $Y$  est le  $n^{\text{ème}}$  point de données ;  $x$ , le temps du  $n^{\text{ème}}$  point ;  $Y_0$ , le niveau basal et  $Y_{\text{ampl}}$  l'amplitude du pic.  $\varphi_1$  est défini comme étant le temps auquel 50 % de l'augmentation du pic est atteinte. De même,  $\varphi_2$  est défini comme étant le temps auquel 50 % de la descente du pic est atteinte.  $S_1$  et  $S_2$  sont respectivement les pentes de la montée et de la descente du pic, ces pentes sont ajustées de façon à obtenir le meilleur coefficient de corrélation possible entre la régression et les valeurs expérimentales obtenues. Ainsi, la durée du pic est définie comme la différence entre  $\varphi_2$  et  $\varphi_1$ .

L'ensemble des résultats numériques obtenus ont été traités par diverses analyses de variances suivies des tests *ad hoc*.

## **D. Résultats expérimentaux**

Au travers de l'étude de différentes sorties de l'horloge, nous étudierons les effets sur l'horloge de deux stimulations différentes. La première stimulation, faisant l'objet de la première partie, est l'application ponctuelle de mélatonine à la transition jour/nuit. La seconde stimulation est la variation de la photopériode dont l'effet a été testé sur deux espèces, le rat et l'Arvicanthis.

### **1. Effet de la mélatonine exogène sur deux sorties de l'horloge : les rythmes de mélatonine et de corticostérone.**

L'application de mélatonine exogène induit une augmentation durable de l'amplitude de sécrétion de mélatonine endogène sécrétée par la glande pinéale *via* une action sur l'horloge (Bothorel *et al.*, 2002). La question se pose de savoir si cet effet sur l'amplitude correspond à une action globale sur l'horloge, ou s'il s'agit plutôt d'une action sur une partie plus restreinte de l'horloge contrôlant spécifiquement la sécrétion de mélatonine. Pour répondre à cette question, il a été nécessaire de mesurer les effets de l'application de mélatonine exogène, non seulement sur la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale, mais aussi sur une autre sortie de l'horloge circadienne : la sécrétion de corticostérone.



# **A functional subdivision of the circadian clock is revealed by differential effects of melatonin administration**

Laurent Tritschler, Michel Saboureau, Paul Pévet and Béatrice Bothorel

Neuroscience Letters (2005) *in press* doi:10.1016/j.neulet.2005.11.007, accepté le 5 novembre 2005

## **Abstract**

The biological clock of the suprachiasmatic nuclei drives numerous physiological and behavioural circadian rhythms. In this study, we addressed the question as to whether different components of the clock may control separately various circadian functions. Using the rat transpineal microdialysis tool, we analyzed the effect of clock perturbation by exogenous melatonin injection on two hormonal clock outputs: pineal melatonin and adrenal corticosterone secretions. As already reported, a single melatonin injection at the light/dark transition induces a marked increase in the endogenous pineal melatonin peak for the two following days. In the same animals, by contrast, the amplitude of the corticosterone rhythm was not altered following melatonin injection. These data show that the melatonin injection does not display an overall effect on the circadian clock, but rather influences a subpopulation of melatonin-sensitive neurons involved, among other functions, in the circadian control of the pineal pathway.

## Introduction

In mammals, the central biological clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus, is known to control daily rhythms in behaviour as well as in physiological and hormonal parameters [3], of which the rhythm of melatonin synthesis by the pineal gland is one of the best examples [15; 18].

One unresolved question concerning the extensive SCN control of numerous daily rhythms is whether it involves the entire SCN or several subsets of SCN cells. To address this question, we used the well known feed-back effect of melatonin on SCN rhythmicity. When applied at the light/dark transition, exogenous melatonin can entrain circadian rhythms *in vivo* [19; 21] or *in vitro* [13]. Additionally, using the transpineal microdialysis technique, we have shown that application of exogenous melatonin induces a long-term increase in the amplitude of endogenous secretion of melatonin. This effect is the result of a direct action of melatonin on the SCN, and was observed only when melatonin is applied at the light/dark transition [2].

To test whether the clock controls separately its various outputs, we capitalized on this effect of exogenous melatonin. If melatonin induces a global increase in clock oscillations, we should observe an increase in the amplitude of other clock-controlled rhythms. The daily rhythm of corticosterone secretion is a suitable candidate because this hormone displays a typical circadian rhythm [14] in which, as for melatonin, the pivotal role of the autonomic nervous system has been demonstrated [4]. Using our recently developed microdialysis technique allowing simultaneous assay of both melatonin and corticosterone secretion in the same free-moving animals over several days [16], we decided to study the effect of a single melatonin injection, at the light/dark transition, on the daily rhythms of both melatonin and corticosterone for three consecutive days in the same animals.

## Material and methods

### **Animals**

Male Wistar rats (n=12; 250-300 g) were purchased from Dépré (Douchard, France). The animals were housed in a temperature-controlled room ( $21 \pm 2$  °C) and maintained on a 12hr-light : 12hr-dark lighting regimen (LD 12:12; lights off from 19:00 until 7:00 hr) with dark onset corresponding to Zeitgeber time ZT12. Water and food were available *ad libitum*.

All experiments with animals were performed in accordance with “Principles of laboratory animal care” (NIH pub. N° 86-23, revised 1985) as well as with the french national laws.

### ***Surgery and dialysis***

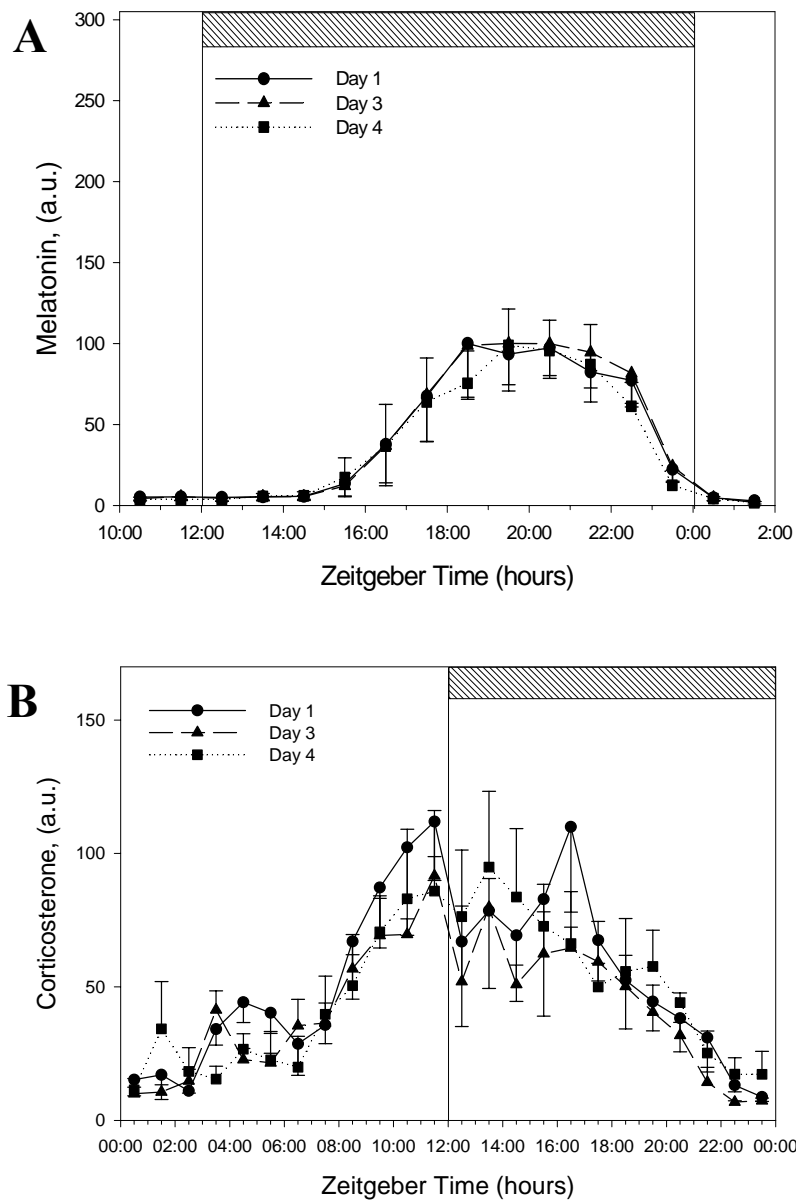
The animals were anaesthetised with tiletamine/zolazepam (20 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (15 mg/kg body weight, i.p.). After surgery, animals were allowed to recover for one week in individual cages. Implantation of the microdialysis probe in the pineal gland was performed as previously described [1; 7]. The dialysis membrane was saponified cellulose ester (0.22 mm inside diameter, 0.27 mm outside diameter, 10 000 molecular mass cut off). During the experiment, the probe inlet was connected by polyethylene tubing to a microinjection pump (PhD 2000, Harvard, Les Ulis, France) *via* a fluid swivel (375/22, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA). The swivel was attached to a counterbalance beam allowing the animal to move freely. The probe was perfused with Ringer’s solution at a flow rate of 3 µl/min. The outlet connection of the probe consisted of polyethylene tubing (0.3 mm inside diameter, 0.7 mm outside diameter) connected to a 1.5-ml polypropylene microvial. Another polyethylene tube catheter was subcutaneously implanted in each animal to inject melatonin or vehicle without handling the animals.

### ***Experimental procedure***

Rats were divided into two groups: vehicle-injected (Group I) and melatonin-injected (Group II). Melatonin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France; 1 mg/kg b.w. dissolved in 5% ethanol/Ringer) or vehicle (5% ethanol in Ringer) were injected at ZT 12 subcutaneously through the previously implanted catheter (ZT12 being the only time at which melatonin administration had an effect on the amplitude of the endogenous melatonin rhythm [2]). Dialysates were collected hourly from ZT0 to ZT24 the day before (Day 1) and two days after (Day 3 and Day 4) melatonin or vehicle administration (on Day 2). Sampled dialysates were stored at –20 °C until assayed by radioimmunoassay (RIA). At the end of the experiment, the rats were decapitated and the brain dissected with pineal gland. The brain was frozen and cryostat sections of the brain/pineal were mounted for microscope observation to control for probe location.

## ***Radioimmunoassays (RIA)***

Melatonin concentration in dialysates was determined in duplicates of 25 µl samples by RIA using a specific rabbit antiserum (R19540 final dilution of 1/90 000) provided by INRA (Nouzilly, France) and [<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin. The limit of sensitivity of the assay was 0.5 pg/tube. The direct melatonin assay was previously validated for dialysates [1]. Corticosterone concentration in dialysates was determined in duplicates of 25 µl samples by RIA using a commercially available [<sup>125</sup>I]-corticosterone RIA kit (ICN Biomedical Division, Carson, CA, USA). The limit of sensitivity of the assay was 25 pg/ml. The method was previously validated for dialysates [16].



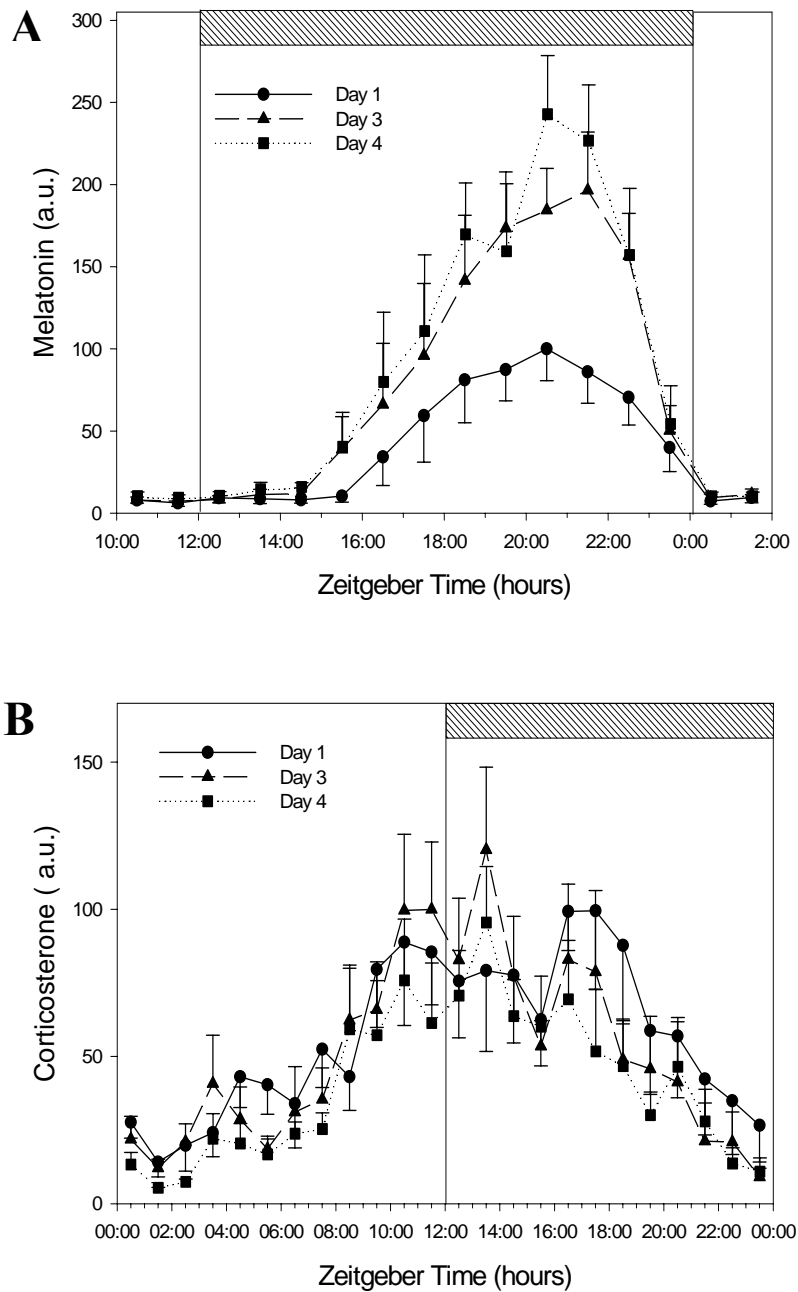
**Figure 1:** Averaged profiles of melatonin (A) and corticosterone (B) concentrations in the pineal gland of all rats from Group I ( $n = 4$ ) measured during the first control day (Day 1) and during the two days (Day 3 and Day 4) following a single subcutaneous injection of vehicle at ZT12. Data are plotted as mean  $\pm$  SEM and expressed relative to the highest value observed on control Day 1 (100 in arbitrary units, a.u.). The striped bar represents the dark period of the LD 12:12 cycle.

## **Data analysis and statistics**

Data from all experiments are expressed as mean  $\pm$  SEM of correctly implanted animals (Group I n=4 out of 6; Group II, n=5 out of 6). The highest value of the hormonal peak observed during the control Day 1 was taken as 100 (in arbitrary units), and all other values observed during the following days were expressed relative to this reference. For each group, raw data were analysed using a two-way MANOVA considering the day (3 levels: Day 1, Day 3, Day 4) and the time of day (16 or 25 levels depending on the hormone) as repeated measures within subject factors. If F values were appropriate, MANOVA analyses were followed by a Student–Newman–Keuls *post-hoc* test. The level of statistical significance was set at 0.05 throughout.

## **Results**

As previously demonstrated, successive melatonin profiles measured in the same animal were highly reproducible over several days. No effect of vehicle injection was detected (Fig. 1A). The duration of the control melatonin peak obtained by non-linear regression [2] was  $5.81 \pm 0.11$ hr. By contrast, melatonin injection on Day 2 induced a sustained increase in amplitude of melatonin secretion on Days 3 and 4 compared to that measured on Day 1 in the melatonin-injected Group II: MANOVA revealed a significant increase [ $F(2,8) = 22.42, p < 0.001$ ] of 100-130 % in the amplitude observed on Day 3 ( $p < 0.01$ ) as well as on Day 4 ( $p < 0.01$ ) compared to Day 1 (Fig 2A). The corticosterone secretion profile obtained by transpineal microdialysis was also highly reproducible for several days in the vehicle-injected Group I (Fig 1B). A significant rhythmic secretion was detected [ $F(23,69) = 7.28, p < 0.001$ ] with maximal values at the light/dark transition, without significant effects of vehicle injection given at ZT12 on Day 2. The corticosterone concentration was minimal during the first part of the light period, then started to increase at about ZT8 to reach maximal values from the light/dark transition until the middle of the dark period. Duration of the corticosterone peak obtained by non-linear regression was  $10.92 \pm 0.31$  hr. Melatonin injection had no effect on the corticosterone secretion profile in melatonin-injected Group II (Fig 2B): statistical analysis did not reveal any significant effect of melatonin application on Day 2 on the corticosterone rhythm in the two following days.



**Figure 2:** Averaged profiles of melatonin (A) and corticosterone (B) concentrations in the pineal gland of all rats from Group II ( $n = 5$ ) measured during the first control day (Day 1) and during the two days (Day 3 and Day 4) following a single subcutaneous injection of melatonin (1 mg/kg b.w.) at ZT12 on Day 2. Data are plotted as mean  $\pm$  SEM and expressed relative to the highest value observed on control Day 1 (100 in arbitrary units, a.u.). The striped bar represents the dark period of the LD 12:12 cycle.

## Discussion

In the present work, we showed that our intrapineal microdialysis system permitted reproducible measurement of corticosterone rhythms, even though this hormone is highly sensitive to stress. Hence this technique is valid for analysis of corticosterone as well as melatonin secretion [1;2;7]. It was used here to determine whether modification of central clock activity by melatonin administration at ZT12 may differentially affect two clock outputs, namely melatonin and corticosterone rhythms.

The circadian clock controls melatonin secretion through the sympathetic nervous system [24], whereas it controls corticosterone secretion by two different pathways: the hypothalamus-pituitary-adrenal axis [5] and the sympathetic system [4] controlling adrenal corticotrophin sensitivity [9]. Melatonin rhythms are driven through the combination of a daytime stimulatory (glutamate) and a nighttime inhibitory (GABA) signal delivered to the paraventricular nuclei (PVN) [11; 16; 17]. Similarly, corticosterone secretion rhythms are driven through a combination of AVP release within the PVN in the middle of the day (constituting the inhibitory signal), and a stimulatory signal still to be identified [10; 12]. It is possible that two systems or two distinct subpopulations of SCN neurons regulate independently both endocrine rhythms. To test this hypothesis, we investigated the effect of melatonin injection at the light/dark transition on both melatonin and corticosterone rhythms.

The present study confirms that exogenous melatonin application markedly increases, for at least the two following days, the amplitude of the endogenous melatonin rhythm in all animals tested [2]. By contrast, melatonin injection did not affect the amplitude of the rhythm of corticosterone secretion in the same animals. The differential effect of melatonin application on two clock outputs, reported here for the first time, suggests that melatonin does not affect the SCN clock as a whole, but possibly affects only the component controlling pineal melatonin secretion. The differential effect of melatonin on these outputs may rely on different populations of SCN neurons, some being melatonin-responsive, or on different downstream elements, some being sensitive to melatonin.

The hypothesis of different subpopulations of SCN neurons is supported by earlier anatomical studies. The SCN can be subdivided according to the neuronal peptide content,



with dorso-medial localisation of vasopressin neurons and ventro-lateral localisation of vasointestinal peptide and gastrin-releasing peptide neurons in the rat [8]. SCN neurons also appear heterogeneous with respect to electrical activity: although the majority of firing activity occurs during the day, some SCN neurons show nocturnal bursts [22]. Importantly, this nocturnal activity appears necessary to induce pineal melatonin secretion [16]. In addition, heterogeneity has also been reported in clock gene expression within SCN neurons. Some *Per1* gene-expressing neurons were found to be in opposite phase compared to global SCN *Per1* expression patterns [25]. Finally, light-induced phase shift of the clock was reported to induce *Per1* and *Per2* gene expression only in a subdivision of SCN [6]. Such anatomical and functional heterogeneity in SCN neuronal populations support the reported differential effect of melatonin on the two hormonal outputs. We hypothesised that a subpopulation of melatonin-sensitive SCN neurons control, among others, the hypothalamo-pineal pathway. To better understand melatonin effects on the clock, it will be interesting to study the distribution of melatonin receptors in the SCN at a cellular resolution. Although some studies have reported the receptor to be present in the SCN AVP neurons [23], systematic analyses of this issue have not been reported due to difficulties in producing a specific antibody.

Recently, it was reported that melatonin injection at the light/dark transition specifically increased SCN *Per3* gene expression on the following day [20]. Whether this effect of melatonin on the clock mechanism is present in all neurons, or in a specialized subset of neurons, and is responsible for the long lasting and specific effect on pineal activity remains to be determined.

In conclusion, the present study shows for the first time that a clock input, melatonin application at the light/dark transition, increases the amplitude of the endogenous rhythm of pineal melatonin without affecting the pattern of adrenal corticosterone release. As melatonin and corticosterone secretion are both under SCN control, it is suggested that exogenous melatonin acts on a subpopulation of neurons controlling pineal melatonin secretion only. A further analysis of the mechanisms involved in the differential effect of melatonin will provide new insight into how the biological clock controls various physiological rhythms.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Pr. J.P. Ravault (INRA, Nouzilly, France) for kindly providing melatonin antiserum, Dr. B. Vivien-Roels for her help in radioimmunoassays and Dr. V. Simonneaux and Dr. D. Hicks for correction of the manuscript.

## References

- [1] S. Barassin, M. Saboureau, A. Kalsbeek, B. Bothorel, B. Vivien-Roels, A. Malan, R.M. Buijs, B. Guardiola-Lemaitre, P Pévet. Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res.* 27 (1999) 193-201.
  
- [2] B. Bothorel, S. Barassin, M. Saboureau, S. Perreau, B. Vivien-Roels, A. Malan, P Pévet. In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur J Neurosci.* 16 (2002) 1090-1098.
  
- [3] R.M. Buijs, A. Kalsbeek Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.* 2 (2001) 521-526.
  
- [4] R.M. Buijs, J. Wortel, J.J. Van Heerikhuize, M.G. Feenstra, G.J. Ter Horst, H.J. Romijn, A. Kalsbeek Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci.* 11 (1999) 1535-1544.
  
- [5] C.S. Cascio, J. Shinsako, M.F. Dallman The suprachiasmatic nuclei stimulate evening ACTH secretion in the rat. *Brain Res.* 423 (1987) 173-178.
  
- [6] H. Dardente, V.J. Poirel, P. Klosen, P. Pévet, M. Masson-Pévet Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res.* 958 (2002) 261-71.
  
- [7] W.J. Drijfhout, C.J. Grol, B.H. Westerink Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications. *J Neurochem.* 61 (1993) 936-942.
  
- [8] A.J. Harmar An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* 15 (2003) 335-338.

- [9] M.S. Jasper, W.C. Engeland Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology*. 59 (1994) 97-109.
- [10] A. Kalsbeek, R.M. Buijs, J.J. van Heerikhuize, M. Arts, T.P. van der Woude Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res*. 580 (1992) 62-67.
- [11] A. Kalsbeek, M.L.Garidou, I.F. Palm, J. Van Der Vliet, V. Simonneaux, P. Pévet, R.M. Buijs. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci*. 12. (2000) 3146-3154.
- [12] A. Kalsbeek, J. van der Vliet, R.M. Buijs Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol*. 8 (1996) 299-307.
- [13] A.J. McArthur, M.U. Gillette, R.A. Prosser Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res*. 565 (1991) 158-61.
- [14] R.Y. Moore, V.B. Eichler Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*. 42 (1972) 201-206.
- [15] R.Y. Moore, D.C.Klein Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 71 (1974) 17-33.
- [16] S. Perreau-Lenz, A. Kalsbeek, M.L. Garidou, J. Wortel, J. van der Vliet, C. van Heijningen, V. Simonneaux, P. Pévet, R.M. Buijs Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 17 (2003) 221-228.
- [17] S. Perreau-Lenz, A. Kalsbeek, P. Pévet, R.M. Buijs Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci*. 19. (2004) 318-324.
- [18] P.Pévet Melatonin and biological rhythms. *Biol Signals Recept*. 9 (2000) 203-212.

- [19] B. Pitrosky, R. Kirsch, A. Malan, E. Mocaer, P. Pévet Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am J Physiol.* 277 (1999) R812-828.
- [20] V.J. Poirel, V. Boggio, H.Dardente, P. Pévet, M. Masson-Pévet, F. Gauer Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci.* 120 (2003) 745-55.
- [21] J. Redman, S. Armstrong, K.T. Ng Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219 (1983) 1089-1091.
- [22] K. Saeb-Parsy, R.E. Dyball Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms* 18 (2003) 26-42.
- [23] C.K. Song, T.J. Bartness, S.L. Petersen, E.L. Bittman SCN cells expressing mt1 receptor mRNA coexpress AVP mRNA in Syrian and Siberian hamsters. *Adv Exp Med Biol.* 460 (1999) 229-232
- [24] R. Teclemariam-Mesbah, G.J. Ter Horst, F. Postema, J. Wortel, R.M. Buijs Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol.* 406 (1999) 171-182.
- [25] S. Yamaguchi, I. Hiromi, M. Takuya, R. Okura, K. Yagita, M. Kobayashi, H. Okamura Synchronisation of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* (2003) 302 1408-1412.

## **Complément de discussion : Effet à long terme de l'application de mélatonine exogène sur la sécrétion de mélatonine endogène.**

L'augmentation de l'amplitude du pic de sécrétion de mélatonine induite par l'application de mélatonine exogène à la transition jour/nuit est un phénomène durable. Ceci traduit une modification tout aussi durable de la neurotransmission des SCN contrôlant la sécrétion de mélatonine. La libération nocturne de glutamate est certainement impliquée dans la mesure où cette libération est à l'origine de l'établissement du pic de sécrétion de mélatonine par la glande pinéale (Perreau-Lenz *et al.*, 2004). Comme pour n'importe quelle autre neurotransmission, celle du glutamate est dépendante de l'activité électrique des neurones qui le libèrent. Par conséquent, l'activité électrique d'au moins une partie des neurones des SCN doit aussi être modifiée par l'application de mélatonine exogène et ceci à long terme puisque la sécrétion de mélatonine endogène est affectée durablement. En effet, la mélatonine diminue non seulement l'activité électrique dans les SCN (Stehle *et al.*, 1989), mais a aussi un effet inhibiteur sur l'induction de la potentialisation à long terme (LTP) dans les SCN (Fukunaga *et al.*, 2002), cette induction résultant de la stimulation du nerf optique (Nishikawa *et al.*, 1995; Nisikawa *et al.*, 1998; Nisikawa *et al.*, 2002). Cet effet inhibiteur de la mélatonine pourrait expliquer les conséquences à long terme de l'application de mélatonine exogène sur sa propre sécrétion par la glande pinéale.

## **2. Le rythme de sécrétion de la corticostérone varie en fonction de la photopériode**

### **2.1. Chez le rat**

Les effets différentiels de l'application de mélatonine exogène à la transition jour/nuit nous ont permis de mettre en évidence que l'horloge était subdivisée, non seulement morphologiquement, mais, aussi du point de vue fonctionnel. Cette injection de mélatonine avait pour but d'affecter l'horloge, mais une telle injection ne reflète en rien une situation physiologique normale observée dans des conditions naturelles. En effet, la mélatonine n'est pas sécrétée à ce créneau horaire, et par ailleurs les concentrations circulantes n'atteignent jamais des taux aussi élevés. Néanmoins il existe des facteurs environnementaux capables de modifier le fonctionnement de l'horloge, c'est le cas de la durée relative du jour et de la nuit (photopériode). Si l'horloge circadienne est entraînée par la lumière (voir § A.1.4.1), elle est aussi affectée par la durée relative de cette dernière dans la journée. La durée de la photopériode est le facteur essentiel de l'information saisonnière pour la plupart des espèces. Contrairement à l'administration de mélatonine exogène, la durée de la photopériode affecte l'expression des gènes horloge dans les SCN, laissant ainsi entrevoir la possibilité d'un effet global sur l'horloge. Afin de tester cette hypothèse nous avons choisi de suivre l'évolution de plusieurs sorties de l'horloge dans trois conditions photopériodiques.

# **Evidence for a global integration and distribution of the photoperiodic information by the circadian clock**

Laurent TRITSCHLER, Michel SABOUREAU, André MALAN, Sylviane GOURMELEN,  
Paul PÉVET and Béatrice BOTHOREL

UMR7168/LC2, Département de Neurobiologie des Rythmes  
5, rue Blaise Pascal  
67084 Strasbourg Cédex  
France

## **Abstract**

In mammals, the master circadian clock located in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN) presents sustained autonomous oscillations and controls several rhythms throughout the organism. The well known consequence of such an integration is that the duration of the pineal melatonin secretion increases with the night duration. In addition, the appearance of this nocturnal peak occurs later when the night is longer. An important element in the understanding of the organisation of the seasonal timing system is to know whether other clock outputs are affected by the photoperiod regimen in the same manner as melatonin secretion is. Thus, in the present study, we simultaneously followed the profiles of three clock outputs (melatonin and corticosterone secretions, and locomotor activity) in rats placed in three photoperiodic conditions : 16 hours light / 8 hours dark (LD 16:8), LD 12:12 and LD 8:16. It appears that the peak of each variable studied here occurred later when the duration of the night increased. The delays observed on the peak onsets were similar for the three clock outputs. For the first time, we showed off that the corticosterone secretion can be considered as a photoperiod-dependent endocrine clock output. In addition, the fact that the three clock outputs studied here were similarly affected by the photoperiod duration suggests that the clock is globally affected, at the physiological level, by the photoperiodic conditions, despite its heterogenous structure.

## Introduction

In mammals, the central biological clock located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN; Stephan & Zucker, 1972) presents sustained autonomous oscillations. The SCN oscillations are generated by the expression of several clock genes, their proteins interacting together to form two feedback loops, a positive one (implicating CLOCK and BMAL 1) and a negative one (implicating PER1,2,3 and CRY1,2) (see Reppert & Weaver, 2002, for a review). This circadian clock oscillates with an endogenous period of around 24 hours, but the SCN require exogenous inputs in order to be synchronized to the environment, the most efficient synchronizer (or Zeitgeber) being the light/dark cycle. The SCN control the daily rhythms of behavioural activities such as sleep-wakefulness cycle and locomotor activity, as well as those of several physiological functions, including body temperature and hormone production (Buijs & Kalsbeek, 2001). Particularly, the SCN control the nocturnal pineal melatonin secretion (Moore & Klein, 1974) *via* the sympathetic system (Tecclemariam-Mesbah *et al.*, 1999). This rhythmic secretion represents a robust marker of the circadian clock activity.

The photoperiod variations, which indicate the seasonal time changes, are integrated by the SCN. This integration is revealed at several levels, and therefore at the molecular level since recent studies showed that the clock genes expression was affected by the photoperiod (Messenger *et al.*, 1999; 2000; Nusslein-Hildesheim *et al.*, 2000; Steinlechner *et al.*, 2002; Tournier *et al.*, 2003). For example, in the Syrian hamster, the duration of the mRNA expression peaks of Per1, Per2, Per3 and Cry2 decreases with the increase of the duration of the night (Tournier *et al.*, 2003). In the same way, at the electrophysiological level, the duration of the action potential peak in the SCN is increased in long photoperiod compared to short photoperiod (Mrugala *et al.*, 2000). The integration of the photoperiodic information was found in the expression of at least one of the clock outputs: the pineal melatonin secretion. Indeed in rodents, the secretion profile of this endocrine secretion is known to be affected by the photoperiod, considering the duration of the peak (Illnerova *et al.*, 1986) or the delay of its appearance after the dark onset (Ribelayga *et al.*, 1999). Thus, melatonin secretion could be considered as a hormonal reflection of the clock activity distributing the daily and the photoperiodic information to the whole body.



The adrenal corticosterone which is another hormonal clock output could also be affected by the photoperiod. Thus, the SCN control melatonin and corticosterone secretions by nervous pathways (see Kalsbeek *et al.*, 2002, for a review). The melatonin secretion is controlled *via* the sympathetic system (Tecclemariam-Mesbah *et al.*, 1999). The corticosterone secretion is controlled by two ways: the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic system, this last nervous pathway modulates adrenal corticotrophin sensitivity (Jasper & Engeland, 1994; Sage *et al.*, 2002). The locomotor activity rhythm is also under control of the clock but by means of a diffusible signal (Silver *et al.*, 1996).

In order to have a general view of the effect of the photoperiod duration on the clock, we simultaneously studied two endocrine outputs (melatonin and corticosterone secretion) and a behavioural output, the general locomotor activity. In the present study, we wanted to see in the rat the effect of the photoperiod integration by the clock at the physiological level by the analysis of the profiles of melatonin secretion, corticosterone secretion and locomotor activity in three photoperiodic conditions : 16 hours light/8 hours dark (LD 16:8), LD 12:12 and LD 8:16. The intrapineal microdialysis was chosen because it allows to measure those two secretion profiles, simultaneously in the same animal without handling it (Perreau-Lenz *et al.*, 2003; Tritschler *et al.*, 2005). The dialysates can be collected at one hour interval, during several days in the free moving animals.

## **Material and methods**

### ***Animals***

Male Wistar rats (n = 42) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The animals were housed in a temperature-controlled room (21 ± 2 °C), they were divided in three groups. The group 1 was maintained in LD 12:12 (lights on from 7:00 until 19:00), the current photoperiodic condition. The group 2, submitted to a long photoperiod (LD 16:8, lights on from 3:00 until 19:00), and the group 3, submitted to a short photoperiod (LD 8:16 lights on from 11:00 until 19:00), were housed in these photoperiodic conditions for seven weeks before dialysis. For comparison between the three groups, we considered the dark onset as the reference time in each condition and it was defined as ZT12. In each photoperiodic condition, the animal groups were divided in two parts : 6 animals were used for microdialysis experiments, and 8 animals were used for locomotor activity analysis, and these studies were simultaneously conducted. Water and food were available *ad libitum*. All

experiments with animals were performed in accordance with “principles of laboratory animal care” (NIH pub N°86-23, revised in 1985) as well as with the French national laws.

### ***Surgery and dialysis***

For surgery, the animals were anaesthetized with tiletamine/zolazepam (20 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (15 mg/kg body weight, i.p.). Implantation of the microdialysis probe in the pineal gland was performed as previously described (Drijfhout *et al.*, 1993; Barassin *et al.*, 1999). After surgery, animals were allowed to recover for one week in an individual cage. The dialysis membrane was saponified cellulose ester (0.22 mm inside diameter, 0.27 mm outside diameter, 10 000 molecular mass cut off). During the experiment, the inlet of the probe was connected with polyethylene tubing (0.38 mm inside diameter, 1.09 mm outside diameter) to a microinjection pump (PhD 2000, Harvard, Les Ulis, France) *via* a fluid swivel (375/22, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA). The swivel was attached to a counterbalance beam allowing the animal to move freely. The probe was perfused with a Ringer’s solution at a flow rate of 3 µl/min. The outlet connection of the probe consisted in a polyethylene tubing (0.3 mm inside diameter, 0.7 mm outside diameter) connected to a 1.5 ml polypropylene microvial.

### ***Experimental procedure***

Dialysates were collected hourly for 24 consecutive hours, simultaneously in the three groups. In order to control the stability of the obtained corticosterone profile, three days after the first dialysis, the same animals were dialysated again for 24 hours. Sampled dialysates were stored at –20 °C until assayed by radioimmunoassay (RIA). At the end of the experiment, the rats were decapitated and the brain was removed in order to control the location of the probe.

### ***Radioimmunoassays (RIA)***

Melatonin concentration in dialysates was determined in duplicates of 25-µl samples by RIA using a specific rabbit antiserum (R19540 final dilution of 1/90 000) provided by INRA (Nouzilly, France) and [<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin. The limit of sensitivity of the assay was 0.5 pg/tube. The direct melatonin assay was previously validated for dialysates (Barassin *et al.*, 1999). Corticosterone concentration in dialysates was determined in duplicates of 25-µl

samples by using a commercially available [<sup>125</sup>I]-corticosterone RIA kit (MP Biomedicals Carson, CA, USA). The limit of sensitivity of the assay was 25 pg/ml, and the method was previously validated for dialysates (Perreau-Lenz *et al.*, 2003).

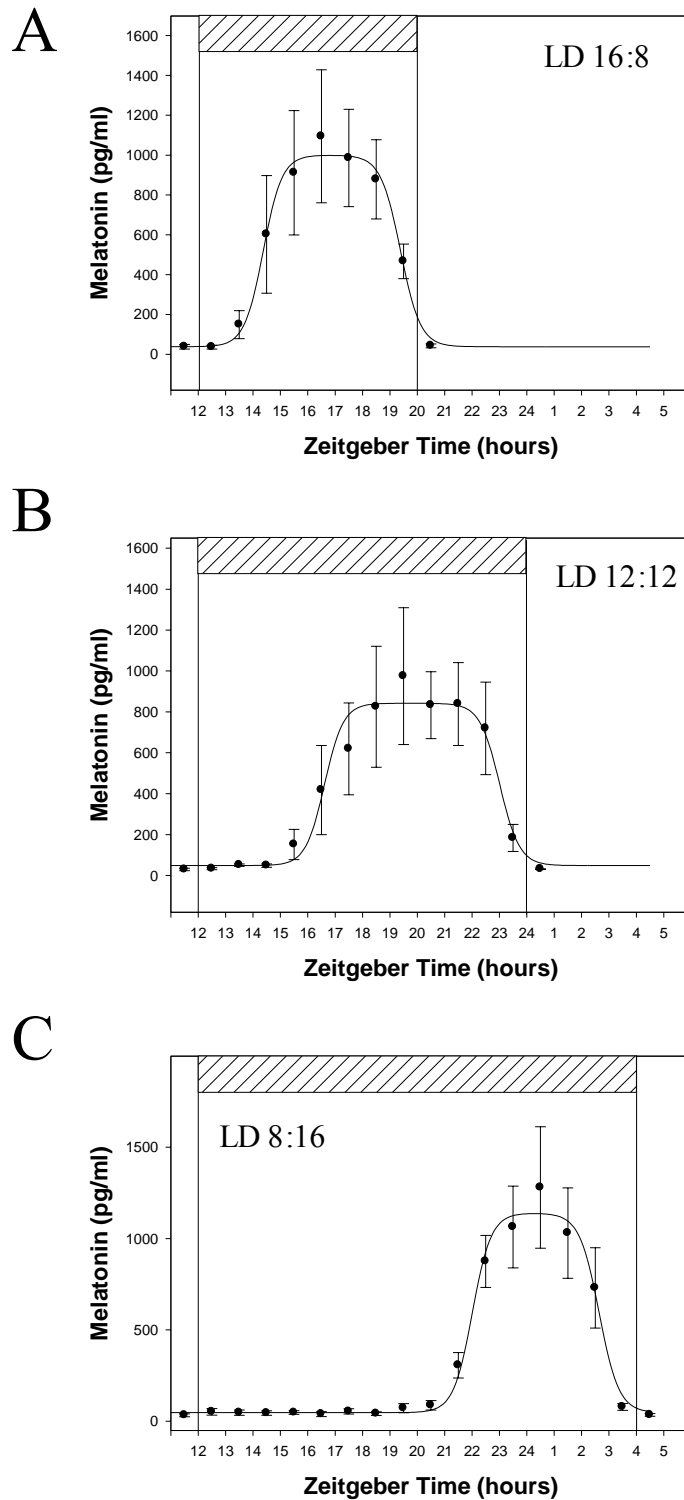
### **General activity measure**

Eight rats used under each photoperiodic condition were implanted intraperitoneally with Mini-Mitter telemetry devices (Mini Mitter Co., Sun River, OR), under a gaseous isoflurane anaesthesia. Afterwards, the animals were allowed to recover for one week after the surgery. General locomotor activity was then recorded every 10 min for 10 successive days (Dataquest III). In order to obtain the locomotor activity profiles, we used data obtained from the 6<sup>th</sup> to the 8<sup>th</sup> day of registration (Data shown on figure 4), these days corresponding to the days of microdialysis experiments for the other part of each group.

### **Data analysis and statistics**

Data obtained for melatonin and corticosterone were expressed in pg/ml assayed in the dialysates. Data for general locomotor activity were expressed in arbitrary units. All of them were given as mean ± SEM of *n* values.

Each pattern of daily variation was characterized by performing a non-linear regression with Sigma Plot (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). As already described (Barassin *et al.*, 1999), each profile was fitted with the following equation (logistic peak):  $y = y_0 + y_{\text{ampl}} / \{[(S_1 + \exp(\varphi_1 - x))] [1 + \exp(S_2 (x - \varphi_2))]\}$ , where *y* is the *n*<sup>th</sup> data point, *x* the time point of the *n*<sup>th</sup> point, *y*<sub>0</sub> the basal level, *y*<sub>ampl</sub> the amplitude of the nocturnal peak,  $\varphi_1$  the inflection point at the onset of the peak and  $\varphi_2$  the inflection point at the offset of the peak. The  $\varphi_1$  and  $\varphi_2$  are expressed in hours (ZT), where ZT12 corresponds to the dark onset in each condition. *S*<sub>1</sub> and *S*<sub>2</sub> represent the slopes of the increase and the decrease of the fitted peak, respectively. They were adjusted beforehand to obtain the best fit and the same values were used throughout, for melatonin profile *S*<sub>1</sub> = 2.91 and *S*<sub>2</sub> = 2.77, for corticosterone *S*<sub>1</sub> = 0.60 and *S*<sub>2</sub> = 0.55 and for locomotor activity *S*<sub>1</sub> = *S*<sub>2</sub> = 3. In the following,  $\varphi_1$  and  $\varphi_2$  were used to



**Figure 1** : Averaged profiles of melatonin concentrations in the pineal gland as a function of the Zeitgeber Time (ZT12: dark onset) in rats under LD 16:8 (A), LD 12:12 (B) and LD 8:16 (C); n = 6 animals under each photoperiodic condition. Hormonal data are plotted as mean  $\pm$  SEM and expressed in pg/ml in the dialysates. The striped bar represents the dark period for each photoperiodic condition.

characterize the timings of the onset and of the offset of the studied peaks, respectively. The duration of peaks was determined as the difference between  $\varphi_1$  and  $\varphi_2$ .

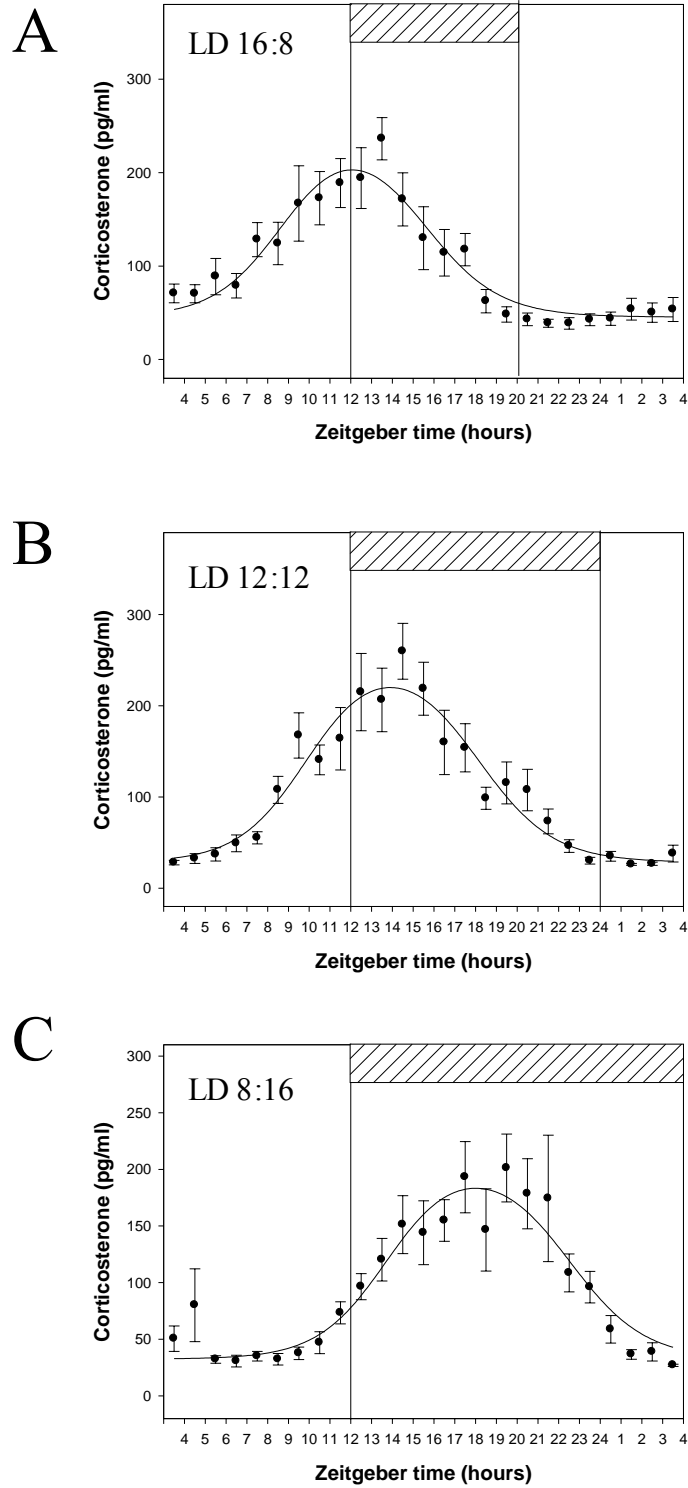
Comparisons between the conditions two by two (e.g. 16:8 vs 12:12) were performed with stepwise multiple regression analysis followed by ANCOVA. To this, common regression was first fitted to all data of the two groups to be compared, with a single value for all parameters ( $y_0$ ,  $y_{\text{ampl}}$ ,  $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$ ). Differences in  $\varphi_1$  and/or  $\varphi_2$  between the two groups were then tested by introducing either two distinct  $\varphi_1$  or two distinct  $\varphi_2$ . The parameter giving the highest F-to enter was retained. The second parameter was then added and similarly tested with F-test. The level of statistical significance was set at 0.05 throughout.

## Results

All the parameters obtained by the non-linear regression were pooled in the tables 1, 2 and 3 for melatonin, corticosterone and general locomotor activity, respectively.

### ***Melatonin profiles***

As expected, the delay of the apparition of the melatonin peak increases with the night length (Fig. 1, Table 1). The difference in  $\varphi_1$  under LD 12:12 compared to LD 16:8 was not significant, but the increase of this delay is very important in LD 8:16 compared to LD 12:12 (Fig. 5A) and highly significant [ $F(1,186) = 75.82$ ,  $p < 0.001$ ]. The delay of the decline of the peak increased also with the night length (Fig. 5B). This  $\varphi_2$  increase was regular and seemed to be proportional to the night duration. The  $\varphi_2$  was significantly different in LD 12:12 compared to LD 16:8, [ $F(1,137) = 16.71$ ,  $p < 0.001$ ] as well as in LD 8:16 compared to LD 12:12 [ $F(1,186) = 31.72$ ,  $p < 0.001$ ]. For the duration of the peaks, a significant increase of the duration was observed under LD 12:12 compared to LD 16:8 [ $F(1,138) = 14.38$ ,  $p = 0.001$ ], but a significant decrease was observed under LD 8:16 compared to LD 12:12, [ $F(1,187) = 20.60$ ,  $p < 0.001$ ] (Fig. 5C).



**Figure 2:** Averaged profiles of corticosterone concentrations in the pineal gland as a function of Zeitgeber Time (ZT12: dark onset) in rats under LD 16:8 (A), LD 12:12 (B) and LD 8:16 (C);  $n = 6$  animals under each photoperiodic condition. Hormonal data are plotted as mean  $\pm$  SEM and expressed in pg/ml detected in the dialysates. The striped bar represents the dark period for each photoperiodic condition.

**Table 1 :** Characteristics of melatonin secretion peak

Photoperiod	Onset $\varphi_1$ (hours)	Offset $\varphi_2$ (hours)	Peak Duration (hours)
LD 16 :8	14.37 $\pm$ 0.31	19.39 $\pm$ 0.32	5.01 $\pm$ 0.50
LD 12 :12	16.61 $\pm$ 0.31	23.01 $\pm$ 0.37	6.39 $\pm$ 0.53
LD 8 :16	22.01 $\pm$ 0.20	26.64 $\pm$ 0.18	4.63 $\pm$ 0.29

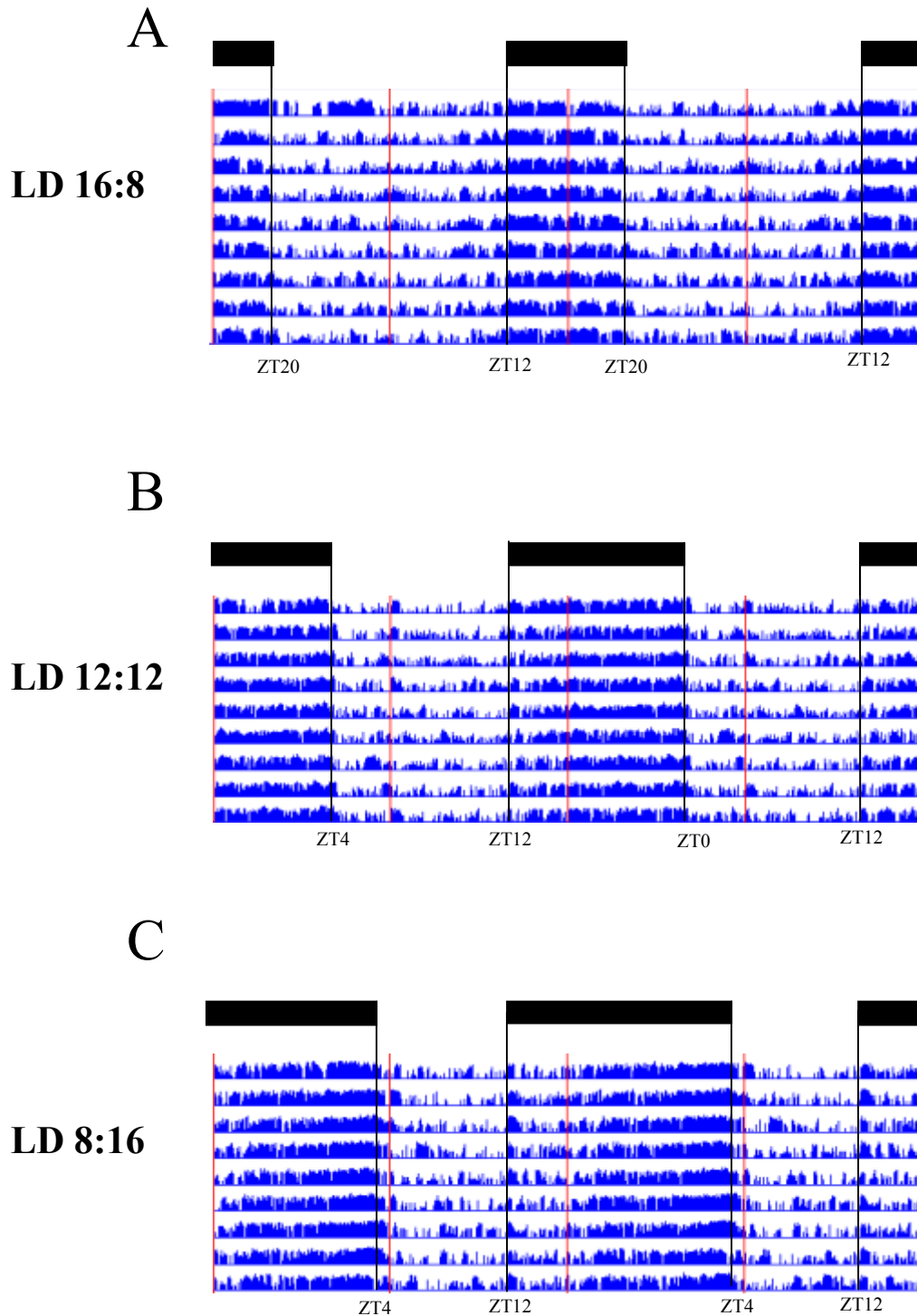
### ***Corticosterone profiles***

As for melatonin secretion, the delay of the appearance of the corticosterone peak increased with the night length (Fig. 2, Table 2). There was a difference in  $\varphi_1$  under LD 12:12 compared to LD 16:8 [ $F(1,294) = 5.53$ ,  $p = 0.019$ ], but the increase of this delay was very important when LD 8:16 was compared to LD 12:12 (Fig. 5A) and highly significant [ $F(1,294) = 71.24$ ,  $p < 0.0001$ ]. The delay of the decline of the peak increased also with the night length. This increase of the  $\varphi_2$  was regular and seemed to be proportional to the night duration (Fig. 5B). The  $\varphi_2$  are significantly different under LD 12:12 compared to LD 16:8, [ $F(1,294) = 23.48$ ,  $p < 0.001$ ] as well as under LD 8:16 compared to LD 12:12 [ $F(1,294) = 29.49$ ,  $p < 0.001$ ]. For the duration of the peaks, a moderate significant increase of the duration was observed under LD 12:12 compared to LD 16:8 [ $F(1,295) = 22.80$ ,  $p < 0.001$ ], but no increase was observed under LD 8:16 compared to LD 12:12 (Fig. 5C).

**Table 2 :** Characteristics of corticosterone secretion peak

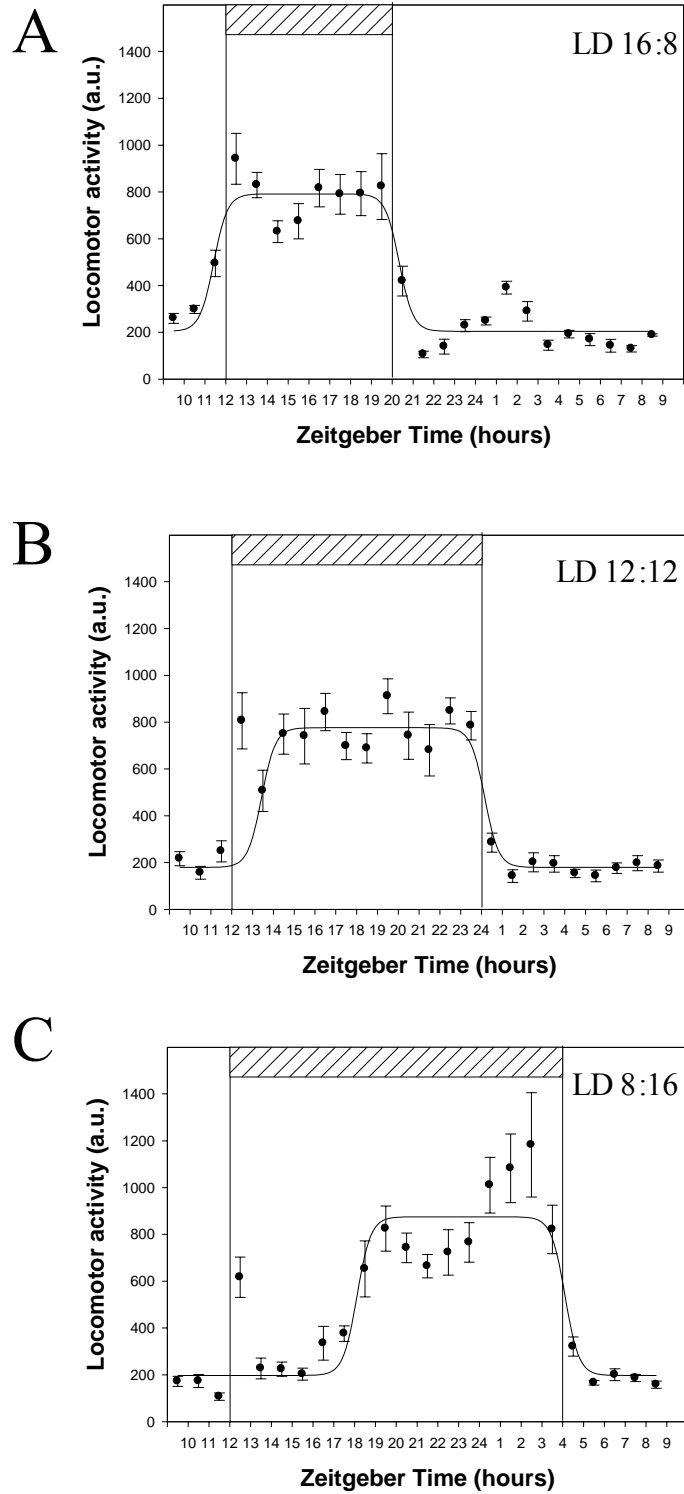
Photoperiod	Onset $\varphi_1$ (hours)	Offset $\varphi_2$ (hours)	Duration (hours)
LD 16 :8	8.84 $\pm$ 0.70	15.40 $\pm$ 0.77	6.55 $\pm$ 1.39
LD 12 :12	9.94 $\pm$ 0.56	18.06 $\pm$ 0.61	8.11 $\pm$ 1.09
LD 8 :16	13.76 $\pm$ 0.72	22.46 $\pm$ 0.77	8.67 $\pm$ 1.36

## Figure 3 :



**Figure 3** : Representative profiles of general locomotor activity in rats under LD 16:8 (A), LD 12:12 (B) and LD 8:16 (C). Successive 24-h periods are double-plotted (48-h locomotor activity on a horizontal time scale). The striped bar represents the dark period for each photoperiodic condition.





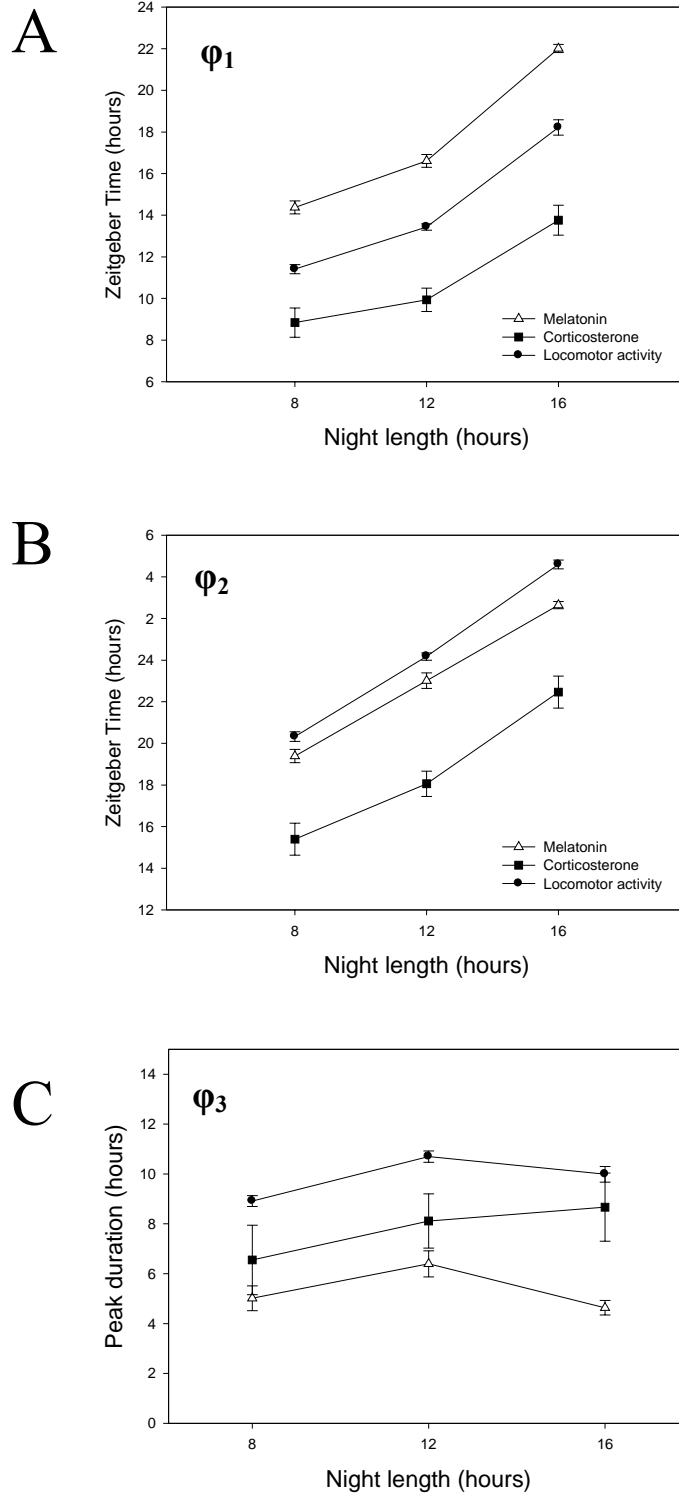
**Figure 4** : Averaged profiles of general locomotor activity as a function of Zeitgeber Time (ZT12: dark onset) in rats under LD 16:8 (A), LD 12:12 (B) and LD 8:16 (C);  $n = 8$  animals under each photoperiodic condition. Data are plotted as mean  $\pm$  SEM and expressed in arbitrary units. The striped bar represents the dark period for each photoperiodic condition.

## **General locomotor activity profiles**

The locomotor activity profiles showed a large peak during night time for all the photoperiods tested (see individual examples in Fig. 3), with a transient small peak observed at the light/dark transition under LD 12:12 as well as under LD 8:16 (Figs. 4B,C), these minor peaks were eliminated for the fitting of the data. As for the two other clock outputs, the delay of appearance of the general locomotor activity peak increased with the night length (Fig. 4). There was a significant difference between the  $\varphi_1$  under LD 12:12 compared to LD 16:8 [F(1,371) = 18.47,  $p < 0.001$ ], as well as for LD 8:16 compared to LD 12:12 [F(1,363) = 79.92,  $p < 0.001$ ] (Fig. 5A). The delay of the decline of the peak increased also with the night length (Fig. 5B). This increase in  $\varphi_2$  was regular and seemed to be proportional to the night duration. The  $\varphi_2$  was significantly different under LD 12:12 compared to LD 16:8 [F(1,370) = 4.04,  $p = 0.045$ ] and under LD 8:16 compared to LD 12:12 [F(1,363) = 118.13,  $p < 0.001$ ]. For the duration of the peaks there was a significant increase in LD 12:12 compared to LD 16:8 [F(1,370) = 4.04,  $p = 0.045$ ], but a significant decrease observed in LD 8:16 compared to LD 12:12 [F(1,362) = 164.62,  $p < 0.001$ ] (Fig 5C).

**Table 3** : Characteristics of locomotor activity

Activity peaks	$\varphi_1$ (hours)	$\varphi_2$ (hours)	Duration (hours)
LD 16 :8	11.42 $\pm$ 0.14	20.33 $\pm$ 0.15	8.92 $\pm$ 0.22
LD 12 :12	13.44 $\pm$ 0.14	24.16 $\pm$ 0.17	10.69 $\pm$ 0.23
LD 8 :16	18.11 $\pm$ 0.21	28.11 $\pm$ 0.21	9.99 $\pm$ 0.32



**Figure 5:** Characteristics of melatonin, corticosterone and general locomotor activity rhythms in rats according to the night duration in the three photoperiodic conditions : A- Onset of the peak ( $\phi_1 \pm \text{SEM}$ ); B- offset of the peak ( $\phi_2 \pm \text{SEM}$ ); C- Peak duration ( $d \pm \text{SEM}$ ). Onset and offset values were given at a ZT time (h) and ZT12 in each experiment was given as the beginning of the night.

## Discussion

As we checked the hormonal profiles three days after our main microdialysis experiment we can certify that the two endocrine clock outputs were stable for several days in the same rat, as well as the general locomotor activity, under each photoperiodic condition (data not shown).

No increase of the duration of the melatonin peak was observed in the short photoperiod LD 8:16 compared to a longer photoperiod, LD 12:12. This corroborates the results of Ribelayga *et al.*, 1999, who obtained the same result in the same strain of rats. In contrast, Illnerova *et al.* showed in 1986 that the duration of the melatonin peak increased in LD 8:16 compared to LD 12:12. We must add that the rats used by Illnerova's team were kept in the short photoperiod for only 3 weeks and thus the clock could have not been completely decompressed. Furthermore, the manipulation of the dark period duration in each photoperiodic condition was realised "around" a reference time and not "from" a reference time that we fixed at the light/dark transition. In our own conditions, where the animals were kept in the short photoperiod for 7 weeks, the clock must be completely decompressed. This period of 7 weeks was chosen because for the Syrian hamster, a photoperiodic rodent, this time is needed to integrate the short photoperiod and to have physiological repercussions (Pévet *et al.*, 1986). Concerning the duration of the melatonin peak, it appears that it does not clearly reflect integration of the photoperiod, at least in LD 8:16. Whatever, the melatonin peaks appeared later when the duration of the night increased, and this parameter is very important to be considered.

For the first time we showed in the present work, that the corticosterone secretion profiles are affected by the photoperiod in the same manner as for the melatonin secretion. Thus, the corticosterone secretion can also be considered as a photoperiodic endocrine clock output. This raises several questions: one of those concerns the possible targets of these photoperiod-induced changes in the body. These targets are supposed to be numerous, since a large number of tissues expressing glucocorticoid receptors (GR) are found in the brain as well as in the periphery (Mc Gimsey *et al.*, 1991). The SCN distribute the timing message to other brain structures as well as to peripheral organs, most of them expressing rhythmically clock genes and have been called peripheral clocks (for a review, see Reppert & Weaver, 2002). An important function of the circadian clock is to orchestrate the peripheral clocks

(Pando *et al.*, 2002), notably by maintaining constant phase relations of the clock genes expression, between all these peripheral tissues. In this view, the clock by means of glucocorticoids could regulate the peripheral clock oscillations. Indeed, Balsalobre *et al.*, 2000 have reported that *in vitro*, the glucocorticoids could induce and shift the clock genes expression in peripheral clocks. Furthermore, in these peripheral clocks, clock genes have been shown to be differentially expressed when hamsters were placed in several photoperiodic conditions (Carr *et al.*, 2004). Our results suggest that glucocorticoids can be considered as an important factor able to convey the photoperiodic information to these peripheral clocks. Other putative targets of the glucocorticoids are the central amygdala (CeA) and the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST-OV), since the glucocorticoids rhythm was shown to be the only factor inducing the rhythmicity in these two limbic structures (Amir *et al.*, 2004 ; Lamont *et al.*, 2005). In the same way, melatonin secretion rhythm is known to be the factor inducing clock genes rhythmicity in the pars tuberalis (Dardente *et al.*, 2003 ; Lincoln *et al.*, 2003; von Gall *et al.*, 2005). The particular sensitivity of these two nuclei (BNST-OV and CeA) to corticosterone can be extended to a sensitivity to several cues such as stress and circadian variations, and our results suggest that they also can be sensitive to the photoperiodic corticosterone variations. Furthermore, it is known that these two limbic structures play a role in the control of emotion and have connections with other nuclei in the brain, like the nucleus of the solitary tract (NST). This suggests that they play a role in the homeostatic regulation by the integration of informations conveyed by the corticosterone secretion profile. Finally, the CeA and the BNST-OV must be considered as a relay in the pathways connecting the adrenal corticosterone secretion and its physiological targets.

The SCN, master circadian clock, are an heterogeneous structure in regards to several points : the clock genes expression (Yamaguchi *et al.*, 2003), the electrical activity (Saeb-Parsy & Dyball, 2003) and the neuropeptides content (Harmar *et al.*, 2003). SCN appear also functionally subdivided, melatonin application inducing different effects in several outputs of the clock (Tritschler *et al.*, in press). Despite its heterogenous structure with subdivisions, the variation of the photoperiod affects, in the same manner, three outputs of the clock (hormonal or behavioural) as shown in our study. This suggests that the photoperiod acts on the global mechanism of the clock, with the same repercussions on at least the three clock outputs studied.

This global effect on the clock according to the photoperiod regimen is in accordance with the results obtained at the molecular level, for the clock genes expression in different hamster species (Tournier *et al.*, 2003; Messenger *et al.*, 1999; 2000; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000; Steinlechner *et al.*, 2002) or in the rat (Sumova *et al.*, 2003). The clock-controlled genes, such as *Avp* are also affected by photoperiodic variations (Sumova *et al.*, 2004; Jac *et al.*, 2000; Duncan *et al.*, 1995).

In conclusion, in the present work we studied, in several photoperiods, the profiles of locomotor activity, melatonin and corticosterone secretions. These three clock outputs were affected in the same way by the variation of the light duration. It seems that the photoperiod affects the circadian clock by a global mechanism, permitting the observed same changes in the studied clock outputs and certainly to all of them.

## References

- Amir S, Lamont EW, Robinson B, Stewart J (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 24:781-790.
- 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* 289:2344-2347.
- Barassin S, Saboureau M, Kalsbeek A, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, Buijs RM, Guardiola-Lemaitre B, Pévet P (1999) Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res* 27:193-201.
- Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2:521-526.
- Carr AJ, Johnston JD, Semikhodskii AG, Nolan T, Cagampang FR, Stirland JA, Loudon AS (2003) Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr Biol* 13:1543-1548.

Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosen P, Pévet P, Masson-Pévet M (2003) Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 114:101-106.

Drijfhout WJ, Grol CJ, Westerink BH (1993) Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications. *J Neurochem* 61:936-942.

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* 32:181-186.

Harmar AJ (2003) An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* 4:335-338.

Illnerova H, Hoffman K, Vanecek J (1986) Adjustment of the rat pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod depends on the direction of the extension of the dark period. *Brain Res* 362:403-408.

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* 887:472-476.

Jasper MS, Engeland WC (1994) Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* 59:97-109.

Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309:109-118

Lamont EW, Robinson B, Stewart J, Amir S (2005) The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4180-4184.

Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg D (2003) Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 15:390-397.

McGimsey WC, Cidlowski JA, Stumpf WE, Sar M (1991) Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology* 129:3064-3072.

Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through *Per1* and *ICER* gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9938-9943.

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* 12:2865-2870.

Moore RY, Klein DC. (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 71:17-33.

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-R994.

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* 12:2856-2864.

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* 17:221-228.

Pévet P, Masson-Pévet M., Vivien-Roels B, Bonn D (1986) Photoperiod, temperature, melatonin, 5-methoxytryptamine and seasonal reproduction: some data on the golden hamster. In: *Advances in Pineal Research*, (RJ Reiter and M Karasek, eds.), John Libley & Coltd, London, vol.1, pp. 185-195.



Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.

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* 2:105-115.

Saeb-Parsy K, Dyball RE (2003) Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms* 18:26-42.

Sage D, Maurel D, Bosler O (2002) Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E458-E465.

Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-813.

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* 17:202-209.

Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 69:1583-1586

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* 18:134-144.

Sumova A, Bendova Z, Sladek M, Kovacikova Z, Illnerova H (2004) Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res* 53:S167-S176.

Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM (1999) Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 406:171-182.

Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pevet M, Pevet P, Vuillez P (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118:317-322.

Tritschler L, Saboureau M, Pevet P, Bothorel B (2005) A functional subdivision of the circadian clock is revealed by differential effects of melatonin administration. *Neurosci Lett* [PMID: 16368190]

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* 1040:508-511.

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408-1412.

## **2.2. Chez l'*Arvicanthis ansorgei***

Le rat, animal nocturne, présente un pic de corticostérone s'étendant de la transition jour/nuit aux heures de la première partie de la nuit dans une photopériode LD 12:12. Nous avons montré que la sécrétion de corticostérone, chez cet animal, était au même titre que la mélatonine, une sortie de l'horloge dépendante de la photopériode. De plus, les variations identiques observées sur différentes sorties de l'horloge (mélatonine, corticostérone et activité locomotrice générale) en réponse à chacune des trois conditions photopériodiques différentes ont montré que l'horloge était affectée de manière globale par la variation de la durée de la photopériode. L'*Arvicanthis ansorgei*, un autre modèle de rongeur, mais cette fois à activité diurne, présente deux pics de sécrétion de corticostérone au cours du nyctémère (Verhagen *et al.*, 2003), ainsi qu'une activité locomotrice biphasique (Challet *et al.*, 2002), en antiphase avec le pic de mélatonine qui est maintenu en période nocturne. Les expériences préliminaires menées au laboratoire montrent que, chez l'*Arvicanthis*, le contrôle circadien du rythme de corticostérone se ferait par des mécanismes différents que ceux décrits pour le rat, et différemment pour les 2 pics de sécrétion. Il était donc intéressant d'étudier chez cet animal l'effet de la photopériode sur cette sortie bimodale de l'horloge, à savoir si l'un ou l'autre des 2 pics de corticostérone ou les deux dépendraient de la photopériode. Nous avons donc étudié l'effet de deux photopériodiques extrêmes, à savoir LD 16:8 (jours longs) et LD 8:16 (jours courts) sur les rythmes de sécrétion de la corticostérone et sur l'activité locomotrice de roue de cet animal, afin de mettre en évidence des variations induites de l'horloge.

# Variations photopériodiques des rythmes de sécrétion de corticostérone et d'activité locomotrice chez l'*Arvicanthis ansorgei*.

## Introduction

L'horloge circadienne principale située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN) contrôle de nombreuses fonctions physiologiques dans l'organisme des Mammifères (Kalsbeek & Buijs, 2002). Pour que les animaux soient en phase avec leur environnement, il faut que l'horloge soit synchronisée par un certain nombre d'informations provenant de cet environnement (voir § A.1.4). Les caractéristiques de ce dernier ne sont pas stables, à l'exception de l'alternance jour/nuit liée à la rotation de la terre sur elle-même. L'alternance quotidienne de lumière/obscurité est un Zeitgeber (ou donneur de temps) très puissant, capable de synchroniser l'horloge circadienne à 24 heures. De même, liées à la rotation de la terre autour du soleil, les variations saisonnières de la durée relative du jour et de la nuit durant le nyctémère, ou photopériode, sont reproductibles d'une année à l'autre. La photopériode représente donc également un Zeitgeber très puissant à l'échelle annuelle et elle serait intégrée par les SCN. Ainsi, dans les SCN, la variation de la durée de la photopériode affecte l'expression des gènes horloge (Tournier *et al.*, 2003; Messenger *et al.*, 1999; 2000; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000; Steinlechner *et al.*, 2002; Sumova *et al.*, 2003), l'activité électrique des neurones (Mrugala *et al.*, 2000) ou l'expression de l'AVP (Sumova *et al.*, 2004, Jac *et al.* 2000, Duncan *et al.*, 1995). Ces modifications au sein de l'horloge ont de nombreuses conséquences sur le plan physiologique et en particulier, sur la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale qui varie en durée et en amplitude. Les variations saisonnières de la mélatonine constituent un message hormonal temporel qui va retentir sur la reproduction de nombreuses espèces dites saisonnières (le mouton, le hamster doré...) (Pévet *et al.*, 1986 ; Malpaux *et al.*, 2002)

Nous avons montré chez le rat (voir chapitre précédent) que la sécrétion de corticostérone, autre sortie endocrine de l'horloge, est affectée par la photopériode, par une variation de la durée et du temps d'apparition de son pic de sécrétion. Chez cet animal, l'ensemble des sorties de l'horloge étudiées (mélatonine, corticostérone et activité

locomotrice) sont affectées de la même manière par la variation de la durée de la photopériode. Ces résultats obtenus chez un rongeur nocturne, sont-ils généralisables et surtout transposables chez des rongeurs diurnes ? Pour répondre à cette question, nous avons choisi comme rongeur diurne l'*Arvicanthis ansorgei*. Ce modèle a pour originalité de présenter 2 pics de sécrétion de corticostérone, ainsi qu'une activité locomotrice biphasique aux transition jour/nuit et nuit/jour, en antiphase avec le pic exclusivement nocturne de sécrétion de mélatonine. Dans cette étude, les profils de corticostérone et d'activité locomotrice de roue ont été déterminés chez des *Arvicanthis ansorgei* soumis à deux photopériodes, une photopériode longue ou jours longs (LD 16:8) et à une photopériode courte ou jours courts (LD 8:16).

## **Matériel et méthodes**

### ***Animaux***

Des *Arvicanthis ansorgei* mâles, adultes (n = 13) provenant de notre propre élevage ont été utilisés. Les animaux en élevage sont maintenus en régime photopériodique de 12 h de lumière/12 h d'obscurité (LD 12 :12), dans des conditions de température contrôlée ( $21 \pm 2$  °C), avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Avant l'expérimentation, les animaux ont été soumis à une photopériode courte (LD 8:16, n = 6) ou à une photopériode longue (LD 16:8, n = 7). Le début de la nuit, défini comme étant ZT12, a été fixé à 19 heures pour les deux groupes d'animaux. L'expérimentation, consistant à mesurer les profils de sécrétion de corticostérone puis l'activité locomotrice de roue a débuté après une stabulation des *Arvicanthis* pendant 7 semaines dans ces conditions photopériodiques.

### ***Chirurgie et microdialyse***

L'intervention chirurgicale a été effectuée au cours de la sixième semaine après le placement des animaux dans leurs photopériodes respectives. Les animaux, sous anesthésie gazeuse (3 % forène), ont été implantés avec une sonde de microdialyse transversale dans la région de la glande pinéale comme décrit précédemment (Drijfhout *et al.*, en 1993, Barassin *et al.*, 1999). La technique de microdialyse a été validée (Perreau-Lenz *et al.*, 2003, Verhagen *et al.*, 2003) pour permettre de mesurer la concentration extracellulaire des glucocorticoïdes qui donne une bonne représentation des concentrations circulantes. Les animaux ont ensuite été dialysés pendant 24 heures au cours des septième et huitième semaines. Pendant l'expérimentation, l'entrée de la sonde a été connectée, par un cathéter en polyéthylène (0.38 mm Di, 1.09 mm De), à une pompe de micro-injection (PhD 2000, Harvard, Les Ulis, France) *via* l'intermédiaire d'un joint tournant (375/22, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA). Ce joint est fixé à un contre-poids permettant à l'animal d'être parfaitement libre de ses mouvements. La sonde est perfusée avec une solution de Ringer à un débit constant de 2  $\mu$ l/min. La sortie de la sonde est connectée à un cathéter de polyéthylène (0.3 mm Di, 0.7 mm De) aboutissant à un tube Ependorf de 1.5 ml servant à la collecte des dialysats.

## **Procédures expérimentales**

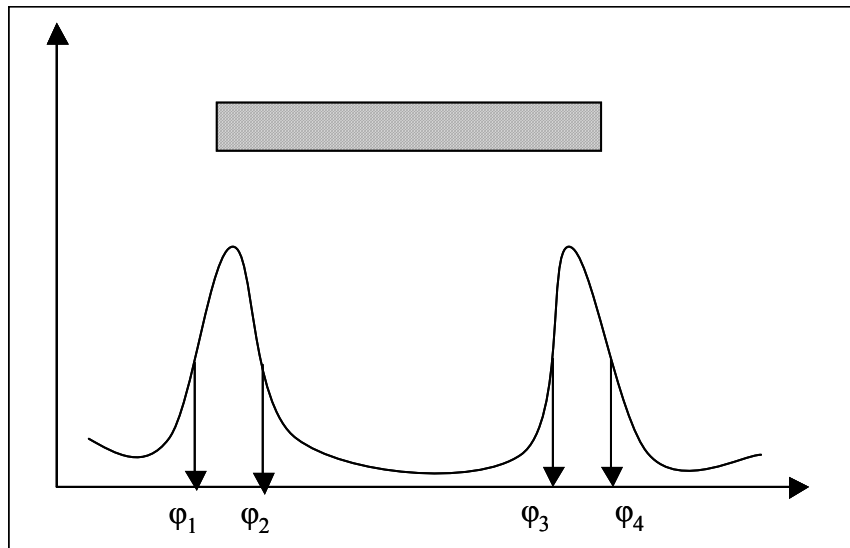
Les dialysats ont été collectés toutes les heures pendant 24 heures consécutives, simultanément pour les deux groupes. Pour augmenter le nombre d'observations ainsi que pour vérifier la stabilité des rythmes obtenus, les dialyses ont été effectuées au cours de la septième et de la huitième semaine, après le début des conditionnements photopériodiques respectifs. Les dialysats ainsi récoltés, ont été stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur dosage radioimmunologique (RIA).

## **Dosage RIA**

Les concentrations en corticostérone dans les dialysats ont été déterminées par doublets de  $25\ \mu\text{l}$  par RIA, en utilisant un kit commercial qui utilise de la corticostérone marquée à l'iode<sup>125</sup> (ICN Biomedical Carson, CA, USA). La limite de sensibilité de ce dosage est de  $25\ \text{pg/ml}$ . Cette méthode a été précédemment validée pour le dosage dans les dialysats intracérébraux (Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Mesure de l'activité locomotrice

## **Mesure de l'activité locomotrice**

Après la deuxième dialyse, les animaux des deux groupes ont été placés dans des cages équipées d'une roue. Le nombre de tours de roue est enregistré et permet d'obtenir les profils d'activité des *Arvicanthis* soumis à une photopériode courte et à une photopériode longue.



**Figure 1** : Schéma du modèle mathématique utilisé pour modéliser les deux pics des profils de sécrétion de corticostérone et d'activité locomotrice avec la représentation des points d'inflexion ( $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$ ,  $\varphi_3$  et  $\varphi_4$ ).



## Analyse des données

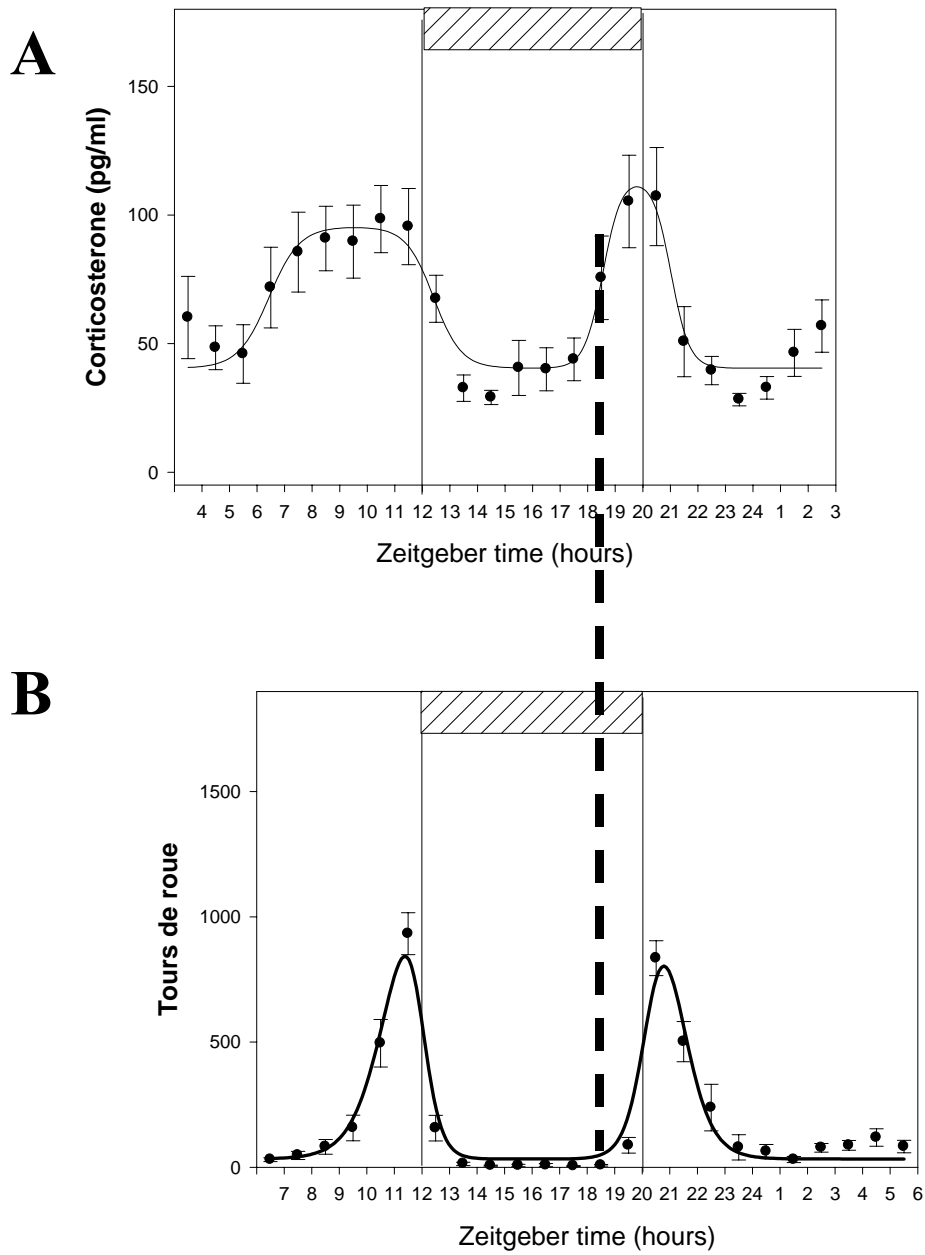
Pour l'analyse et la mise en forme des données obtenues pour les profils des paramètres étudiés (la corticostérone et l'activité locomotrice), le modèle de régression non linéaire suivant a été utilisé :

$$Y = y_0 + \left( \frac{y_{\text{ampl}}}{\left( (1 + \exp(S_1 * (\varphi_1 - x))) * (1 + \exp(S_2 * (x - \varphi_2))) \right)} \right) + \left( \frac{y_{\text{ampl}2}}{\left( (1 + \exp(S_3 * (\varphi_3 - x))) * (1 + \exp(S_4 * (x - \varphi_4))) \right)} \right)$$

où  $y$  est le  $n^{\text{ème}}$  point des données ;  $x$ , le temps du  $n^{\text{ème}}$  point ;  $y_0$ , le niveau basal, et  $y_{\text{ampl}}$ , l'amplitude du premier pic et  $y_{\text{ampl}2}$ , l'amplitude du second pic ;  $\varphi_1$  est défini comme étant le temps auquel 50 % de l'augmentation du premier pic est atteinte. De même,  $\varphi_2$  est défini comme étant le temps auquel 50 % de la descente de ce pic est atteinte.  $S_1$  et  $S_2$  sont respectivement les pentes de la montée et de la descente du premier pic.  $\varphi_3$  est défini comme étant le temps auquel 50 % de l'augmentation du second pic est atteinte.  $\varphi_4$  est défini comme étant le temps auquel 50 % de la descente de ce pic est atteinte. De même que  $S_3$  et  $S_4$  sont respectivement les pentes de la montée et de la descente du second pic (**Fig. 1**). Ces pentes ont été ajustées de façon à obtenir le meilleur coefficient de corrélation possible entre la régression et les valeurs expérimentales obtenues. Les valeurs des pentes utilisées sont consignées dans le Tableau 1.

**Tableau 1** : Valeurs des pentes utilisées pour la modélisation des profils de corticostérone et d'activité locomotrice chez *l'Arvicanthis*.

	Premier pic		Second pic	
	S1 (montée)	S2 (descente)	S3 (montée)	S4 (descente)
Corticostérone	1,8	2	3	3
Activité de roue	1,5	3	2,5	1,8



**Figure 2** : Profils de sécrétion de corticostérone obtenus dans les dialysats (**A**) et profils d'activité locomotrice (**B**) chez l'*Arvicanthis* soumis à une photopériode longue (LD 16:8). La barre hachurée représente la nuit et le trait pointillé montre que le second pic de sécrétion de corticostérone anticipe le second pic d'activité locomotrice.

## Résultats

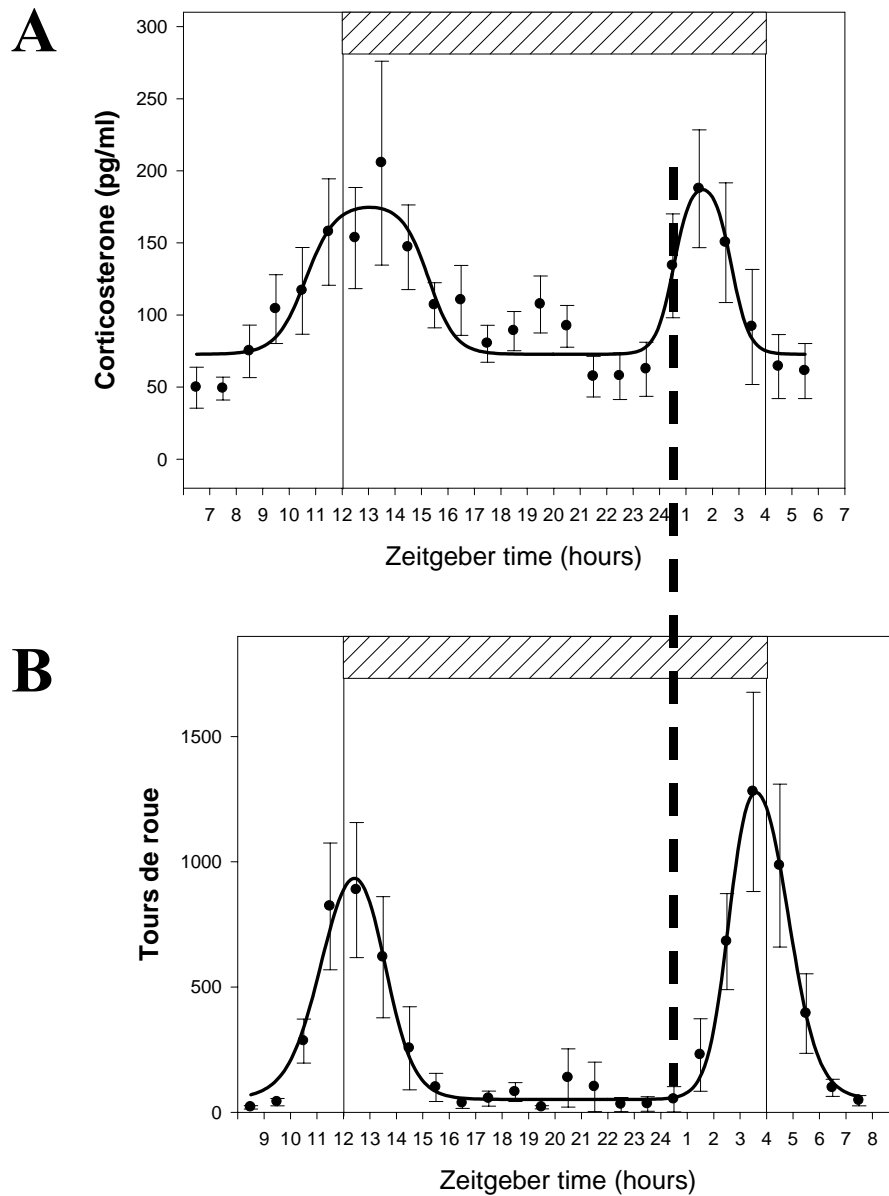
La sécrétion de corticostérone ainsi que les profils d'activité locomotrice sont bimodaux en photopériode longue (**Fig. 2 A, B**) comme en photopériode courte (**Fig. 3 A,B**). Pour les deux sorties de l'horloge, deux pics sont observés : l'un à la transition jour/nuit (1<sup>er</sup> pic) et l'autre à la transition nuit/jour (2<sup>ème</sup> pic). Les caractéristiques de ces pics ( $\phi 1$ ,  $\phi 2$ ,  $\phi 3$  et  $\phi 4$ ) sont récapitulés, pour la corticostérone et l'activité locomotrice, dans les tableaux 2 et 3, respectivement.

**Tableau 2** : Temps de montée et de descente du premier pic ( $\phi 1$  et  $\phi 2$ ) et du deuxième pic ( $\phi 3$  et  $\phi 4$ ) de corticostérone, exprimés en h  $\pm$  SEM dans les deux photopériodes. Les différences significatives entre les deux photopériodes sont indiqués à  $p < 0.05$ .

Corticostérone	LD 16:8	LD 8:16	t	p
$\phi 1$	6,43 $\pm$ 0,45	10,63 $\pm$ 0,53	7,92	<0,05
$\phi 2$	12,41 $\pm$ 0,45	15,28 $\pm$ 0,48	5,98	<0,05
$\phi 3$	18,55 $\pm$ 0,26	24,53 $\pm$ 0,36	16,61	<0,05
$\phi 4$	21,02 $\pm$ 0,32	26,72 $\pm$ 0,40	14,25	<0,05

**Tableau 3** : Temps de montée et de descente du premier pic ( $\phi 1$  et  $\phi 2$ ) et du deuxième pic ( $\phi 3$  et  $\phi 4$ ) de l'activité locomotrice de roue, exprimés en h  $\pm$  SEM dans les deux photopériodes. Les différences significatives entre les deux photopériodes sont indiqués à  $p < 0.05$ .

Activité	LD 16:8	LD 8:16	t	p
$\phi 1$	10,84 $\pm$ 0,09	11,25 $\pm$ 0,59	0,69	NS
$\phi 2$	11,95 $\pm$ 0,08	13,50 $\pm$ 0,49	3,16	<0,05
$\phi 3$	20,24 $\pm$ 0,08	26,58 $\pm$ 0,24	26,41	<0,05
$\phi 4$	21,29 $\pm$ 0,87	28,83 $\pm$ 0,34	8,67	<0,05



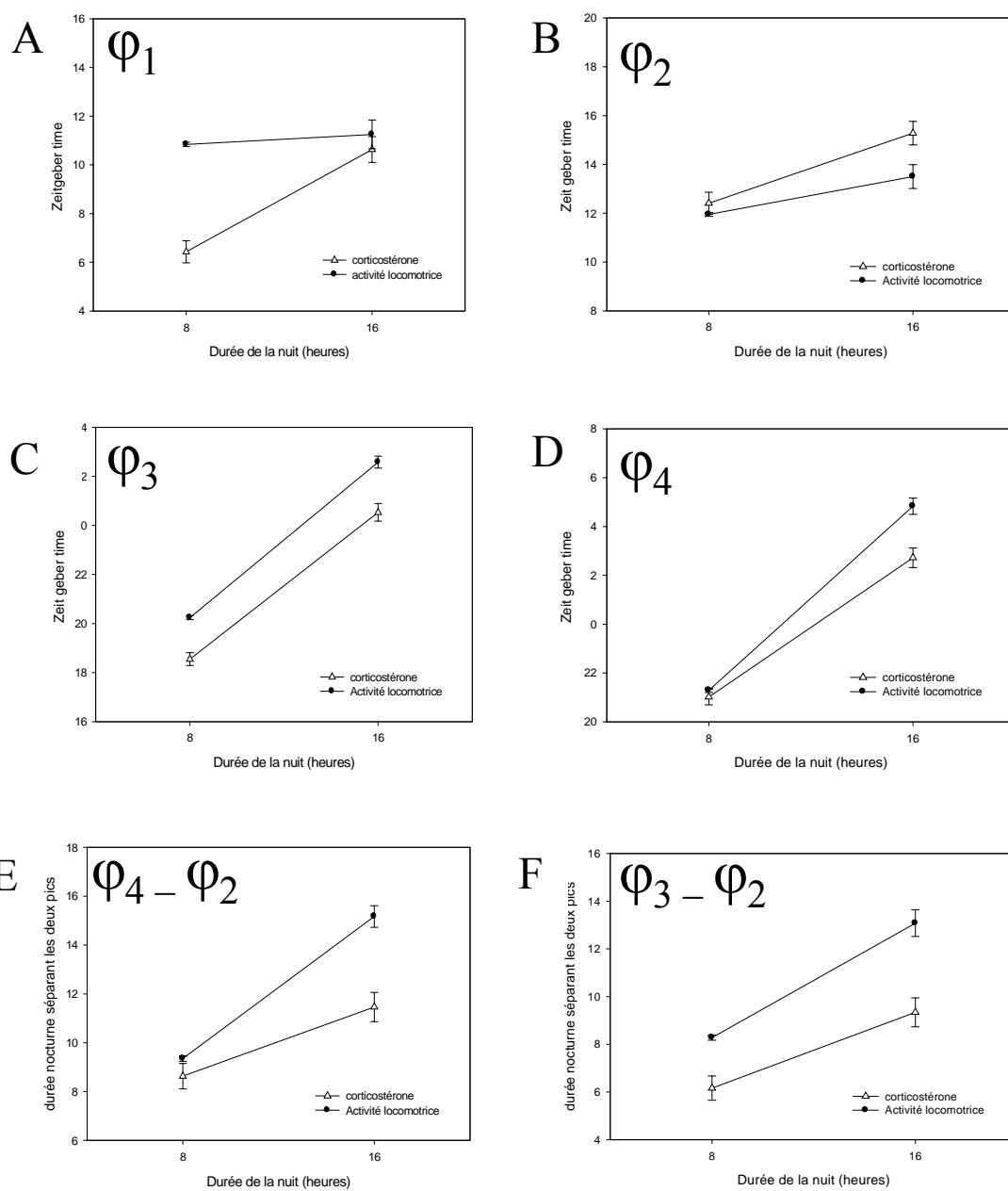
**Figure 3** : Profils de sécrétion de corticostérone obtenus dans les dialysats (**A**) et profils d'activité locomotrice (**B**) chez l'*Arvicanthis* soumis à une photopériode courte (LD 8:16). La barre hachurée représente la nuit et le trait pointillé montre que le second pic de sécrétion de corticostérone anticipe le second pic d'activité locomotrice. La barre hachurée représente la nuit.

Le pic de sécrétion de corticostérone situé à la transition nuit/jour (2<sup>ème</sup> pic) anticipe le pic d'activité quelle que soit la photopériode. Cette anticipation estimée en soustrayant la valeur de  $\phi_3$  obtenue pour la corticostérone à celle obtenue pour l'activité locomotrice est de 1,69 h en photopériode courte et de 2,05 h en photopériode longue. Par contre, ce phénomène d'anticipation, également observé lors de la transition jour/nuit (1<sup>er</sup> pic) en condition de photopériode longue, disparaît en photopériode courte.

Pour chacune des variables étudiées (corticostérone ou activité), la durée qui sépare les pics observés à la transition jour/nuit (1<sup>er</sup> pic) et à la transition nuit/jour (2<sup>ème</sup> pic) peut être quantifiée en faisant la différence entre  $\phi_4$  et  $\phi_2$  (**Fig. 4 E**) ou entre  $\phi_3$  et  $\phi_2$  (**Fig. 4 F**). Ce décalage temporel entre les 2 pics est augmenté en photopériode courte par rapport à celui observé en photopériode longue. Malgré cet écartement, les deux pics d'activité locomotrice de roue sont principalement présents la nuit (63 % de l'activité totale) en photopériode courte, tandis que l'activité des animaux reste majoritairement diurne en photopériode longue (97 % de l'activité totale).

La durée du pic de sécrétion de corticostérone situé à la transition jour/nuit ( $\phi_2 - \phi_1$ ) augmente avec la durée du jour si on compare la photopériode courte à la photopériode longue ( $4,61 \pm 0.81$  vs  $5,98 \pm 0.69$  h).

La durée de la photopériode affecte de façon homogène et équivalente les paramètres  $\phi_2$ ,  $\phi_3$  et  $\phi_4$ , dont leurs valeurs augmentent avec la durée de la nuit (**Figs. 4B, 4C, 4D**). En comparant les deux sorties de l'horloge, l'évolution de ces paramètres est similaire et tend même à être parallèle.



**Figure 4** : Représentation de l'évolution des points d'inflexion des profils de sécrétion de corticostérone et d'activité locomotrice lors du passage de la photopériode longue à la photopériode courte;  $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$ ,  $\varphi_3$  et  $\varphi_4$  étant représentés respectivement en **A**, **B**, **C** et **D**. En **E** et en **F** sont représentées respectivement les différences entre  $\varphi_4$  et  $\varphi_2$ , et entre  $\varphi_3$  et  $\varphi_2$ .

## Discussion

Chez l'Arvicanthus, les profils de sécrétion de corticostérone sont bimodaux en photopériode courte ainsi qu'en photopériode longue, comme cela a été décrit pour la photopériode LD12 :12 (Verhagen *et al.*, 2003). Il en est de même pour les profils d'activité locomotrice de roue qui sont bimodaux dans les deux photopériodes étudiées. Les caractéristiques de ces deux pics d'activité évoluent en fonction de la photopériode, les animaux ayant une activité locomotrice diurne proportionnelle à l'augmentation de la durée du jour. En effet, si l'activité des animaux a lieu exclusivement de jour en photopériode longue (97%), elle a lieu majoritairement de nuit en photopériode courte (63%). Cette observation corrobore d'ailleurs des résultats déjà obtenus chez cette espèce (Challet *et al.*, 2002).

La durée séparant les deux pics (aussi bien d'activité de roue que de sécrétion de corticostérone) augmente avec la durée de la nuit, ce qui se traduit par des décalages de phase des deux pics, en prenant la transition jour/nuit comme référence temporelle. L'augmentation de la durée séparant les pics traduit le fait que la photopériode est intégrée et retentit sur ces deux sorties de l'horloge. L'augmentation de la durée de la photopériode se traduit également par une augmentation de la durée du premier pic de corticostérone situé autour de la transition jour/nuit. Cette augmentation n'est pas corrélée avec le profil d'activité locomotrice mesurée dans la roue, dont la durée du pic ne semble pas être affectée. Il conviendrait de mesurer l'activité locomotrice générale qui serait un bien meilleur marqueur physiologique de l'activité de l'animal (Challet *et al.*, 2002). Ces variations de la sécrétion de corticostérone représentent une sortie saisonnière de l'horloge au même titre que la sécrétion de mélatonine (Garidou-Boof *et al.*, 2005).

Dans les deux photopériodes utilisées pour cette étude, le pic d'activité locomotrice situé à la transition nuit/jour est précédé par le pic de sécrétion de corticostérone situé à cette même transition. Une telle anticipation est caractéristique des espèces diurnes (Weibel *et al.*, 1995). Par contre, une anticipation est plus difficile à mettre en évidence pour les pics de corticostérone et d'activité locomotrice à la transition jour/nuit. En photopériode courte, il semble même que ces pics coïncident. L'analyse de l'activité locomotrice générale, ainsi qu'une analyse temporelle plus fine de la relation de phase entre les deux pics serait

nécessaire, par un échantillonnage plus fréquent. Ces nouvelles données apporteront certainement des éléments supplémentaires dans l'analyse de ce phénomène.

L'anticipation du pic d'activité par le pic de corticostérone à la transition nuit/jour, et l'anticipation moins nette pour la transition jour/nuit, n'empêche pas pour autant l'horloge circadienne d'affecter les deux pics des deux sorties considérées dans ce travail. La variation photopériodique des points d'inflexion des différents pics étant globalement homogène et quasiment parallèle. Ceci montre que la variation de la photopériode est intégrée de façon globale par l'horloge circadienne de l'*Arvicanthis*, d'une manière équivalente à celle décrite chez le rat (voir chapitre précédent). Ainsi l'information photopériodique intégrée globalement par les SCN serait distribuée par ceux-ci par ses différentes sorties, dont les caractéristiques varieraient de façon équivalente avec les conditions photopériodiques. Ces données sont également complétées par l'analyse des profils de sécrétion de mélatonine chez cette espèce, dont la sécrétion nocturne débute au même moment quelle que soit la photopériode en utilisant la transition jour/nuit comme point de référence temporel. Comme pour les autres sorties de l'horloge le pic de mélatonine se termine de plus en plus tard lorsque la durée de la nuit augmente (Garidou-Boof *et al.*, 2005), ce qui est un argument supplémentaire encore en faveur d'une intégration globale de la photopériode par l'horloge circadienne, avec un retentissement similaire pour toutes ses sorties.

Les conséquences physiologiques induites par un changement de photopériode chez l'*Arvicanthis* sont du même ordre que celles obtenues chez le rat. Dans la mesure où les SCN de l'*Arvicanthis* présentent des profils d'expression des gènes horloge similaires à ceux observés chez des rongeurs nocturnes (Caldelas *et al.*, 2003), il est fort probable que l'expression des gènes horloge est affectée par la variation de la photopériode dans les SCN chez les animaux diurnes au même titre que chez les animaux nocturnes (Tournier *et al.*, 2003 ; Messenger *et al.*, 1999; 2000; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000; Steinlechner *et al.*, 2002; Sumova *et al.*, 2003). Cette démonstration moléculaire reste cependant à faire.

En résumé, chez l'*Arvicanthis*, la sécrétion de corticostérone est une sortie endocrine saisonnière de l'horloge au même titre que la sécrétion de mélatonine. L'analyse de plusieurs sorties de l'horloge a également montré que l'horloge intègre de façon globale les informations photopériodiques, ce qui retentit uniformément sur plusieurs de ses sorties.



## Références

Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pevet P, Challet E (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 116:583-591.

Challet E, Pitrosky B, Sicard B, Malan A, Pévet 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.

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* 105:721-729.

Garidou-Boof ML, Sicard B, Bothorel B, Pitrosky B, Ribelayga C, Simonneaux V, Pevet P, Vivien-Roels B (2005) Environmental control and adrenergic regulation of pineal activity in the diurnal tropical rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *J. Pineal Res.* 38:189-197.

Drijfhout WJ, Grol CJ, Westerink BH (1993) Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications. *J Neurochem* 61:936-942.

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* 32:181-186.

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* 887:472-476.

Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309:109-118.

Malpoux B, Tricoire H, Mailliet F, Daveau A, Migaud M, Skinner DC, Pelletier J, Chemineau P (2002) Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl.* 167-179.

Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9938-9943.

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* 12:2865-2870.

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* 12:2856-2864.

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* 17:221-228.

Pévet P, Masson-Pévet M., Vivien-Roels B, Bonn D (1986) Photoperiod, temperature, melatonin, 5-methoxytryptamine and seasonal reproduction: some data on the golden hamster. In: *Advances in Pineal Research*, (RJ Reiter and M Karasek, eds.), John Libbey & Coltd, London, vol.1, pp. 185-195.

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* 17:202-209.

Sumova A, Bendova Z, Sladek M, Kovacikova Z, Illnerova H (2004) Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res* 53:S167-S176.

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* 18:134-144.

Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pevet M, Pevet P, Vuillez P. (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118:317-322.

Verhagen LA, Pevet P, Saboureau M, Sicard B, Nesme B, Claustrat B, Buijs RM, Kalsbeek A (2003) Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Res* 995:197-204.

Weibel L, Follenius M, Spiegel K, Ehrhart J, Brandenberger G (1995) Comparative effect of night and daytime sleep on the 24-hour cortisol secretory profile. *Sleep*. 18:549-556.

## **E. Discussion générale**

### **1. Administration de mélatonine et photopériode : deux stimuli avec des effets différents sur l'horloge**

Nous avons testé l'influence de deux stimuli différents sur l'horloge, l'application de mélatonine exogène à ZT12 et le changement de photopériode, en étudiant plusieurs sorties de cette horloge. *A priori*, il était tout à fait envisageable que des facteurs aussi différents puissent avoir des effets différents sur l'horloge circadienne et donc sur les caractéristiques de ses sorties utilisées comme index du fonctionnement de cette horloge. D'une part, l'application de mélatonine exogène, agit sur l'horloge (Bothorel *et al.*, 2002), en affectant à long terme la sécrétion de mélatonine endogène sans pour autant retentir sur la sécrétion de corticostérone. D'autre part, des photopériodes différentes affectent l'horloge d'une manière plus globale, se traduisant par des variations équivalentes (mêmes décalages de phase) sur plusieurs de ses sorties (sécrétion de mélatonine, sécrétion de corticostérone, activité locomotrice).

Les effets différentiels de ces deux stimuli, observés sur les sorties de l'horloge, sont liés aux caractéristiques de la stimulation. Dans le cas de la photopériode, plusieurs facteurs sont certainement en jeu, à savoir la durée de la stimulation et sa puissance. En effet, la photopériode est perçue par les animaux durant plusieurs semaines et en outre, la lumière, constitue le *Zeitgeber* le plus puissant de l'environnement agissant sur l'horloge (voir §A.1.4.). Par contre, la durée de l'injection de mélatonine (à ZT12) est ponctuelle et, par ailleurs, la mélatonine est considérée comme un *Zeitgeber* non-photique. Cette différence de puissance des deux stimuli utilisés est aussi visible d'un point de vue moléculaire. En effet, même un simple créneau lumineux ponctuel appliqué durant la nuit (ou la nuit subjective), résulte en une induction forte et immédiate de la transcription des gènes *Per1* (Shigeyoshi *et al.*, 1997), *Per2* (Sherman *et al.*, 1997) et *Dec1* (Honma *et al.*, 2002). Par contre, l'application de mélatonine à ZT12 n'a qu'un effet plus restreint et plus tardif sur la transcription des gènes horloge : seule une avance de phase de *Rev-erba* ayant été observée le jour suivant l'injection (Agez *et al.*, communication personnelle).

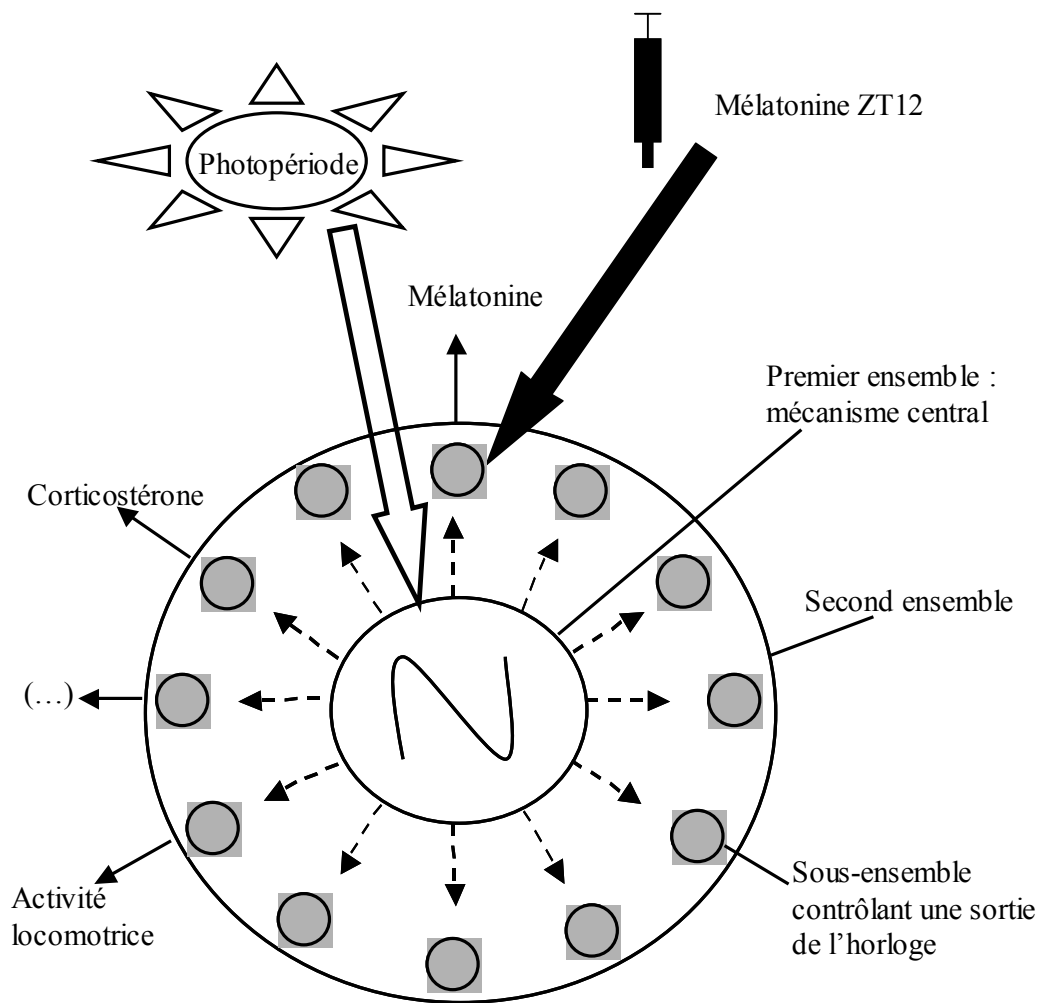
## 2. La sécrétion de corticostérone : une sortie saisonnière de l'horloge

Nous avons montré, pour la première fois, que les caractéristiques (durée et phase) de la sécrétion de corticostérone variaient avec la durée de la photopériode, faisant ainsi de cette sortie endocrine de l'horloge, une sortie photopériodique au même titre que la sécrétion de mélatonine. Ces deux hormones présentent apparemment des différences quant au contrôle de grandes fonctions physiologiques. Pour la mélatonine, les variations saisonnières ont un rôle connu : le contrôle de la reproduction chez les espèces saisonnières. Par contre, le rôle joué par les variations photopériodiques des glucocorticoïdes est moins connu, si ce n'est dans l'adaptation de l'animal à son environnement (exemple, éveil printanier). On peut aussi penser que le système immunitaire peut être dépendant de telles variations dans la mesure où il existe une relation étroite entre ce système et les glucocorticoïdes. Par exemple, il existe une variation nyctémérale du rapport des lymphocytes Th1 et Th2 (Franchimont, 2004) qui est directement dépendante du rythme de sécrétion des glucocorticoïdes. Si ce ratio réagit si promptement à ce rythme circadien, il est fort probable qu'il réponde aussi aux variations photopériodiques de la sécrétion de ces mêmes glucocorticoïdes. Une autre cible prometteuse pourrait être la relation qui existe entre les glucocorticoïdes et le taux plasmatique de glucose ; en effet, même si le foie et le pancréas contribuent largement à l'établissement du rythme de glucose dans le sang, on ne peut pas négliger le rôle hyperglycémiant des glucocorticoïdes qui doivent eux aussi participer à l'établissement de ce rythme.

Dans l'organisation même des systèmes circadien et saisonnier, les glucocorticoïdes sont de bons candidats pour être utilisés par l'horloge dans la distribution de l'information photopériodique aux oscillateurs périphériques. Ces derniers présentent des variations saisonnières de l'expression des gènes horloge (Carr *et al.*, 2003) et ils répondent à l'application de glucocorticoïdes par des décalages de phase (Balsalobre *et al.*, 2000). Dans des conditions physiologiques, il semble que l'expression des gènes horloge dans certains organes périphériques soit sous le contrôle des SCN par l'intermédiaire de facteurs humoraux (Guo *et al.*, 2005). Le cas du foie, riche en récepteurs pour les glucocorticoïdes, constitue une cible potentielle de l'horloge particulièrement intéressante pour étudier les effets des variations saisonnières de la sécrétion de glucocorticoïdes sur l'expression des gènes horloge. Il convient de mentionner aussi que les glucocorticoïdes sont connus pour agir directement dans le foie en y favorisant la néoglucogénèse.

Par ailleurs, il existe au sein même du système nerveux central, une structure très intéressante qui est l'amygdale centrale (CeA). Cette structure limbique présente un rythme d'expression des gènes horloge, dans des conditions physiologiques stables. A la suite d'une surrénalectomie pratiquée chez le rat, le rythme d'expression d'au moins un des gènes horloge (*Per2*) est aboli (Lamont *et al.*, 2005). Ainsi, la relation de dépendance liant cette structure amygdalienne à la sécrétion des glucocorticoïdes peut être mise en parallèle avec le lien qui existe entre la sécrétion de mélatonine et l'induction du rythmes des gènes horloge dans la pars tubéris (Dardente *et al.*, 2003 ; Lincoln *et al.*, 2003).

Il apparaît donc nécessaire de prendre en compte les glucocorticoïdes, non seulement comme messager du stress, mais aussi comme un messager à la fois circadien et photopériodique, ayant des fonctions essentielles dans le maintien de l'homéostasie. Ils joueraient un rôle important dans l'adaptation à un changement d'environnement et donc dans la survie des animaux.



**Figure 10** : Proposition d'un modèle d'organisation de l'horloge suivant les deux ensembles décrits au § E.3.

### **3. L'horloge : une nouvelle vision de son organisation fonctionnelle**

L'étude des effets de l'application de mélatonine exogène à ZT12 a mis en évidence la subdivision fonctionnelle de l'horloge circadienne. Une telle subdivision rend compte de la complexité de l'organisation des SCN. En effet, ces noyaux ont été subdivisés morphologiquement, en relation avec la détection de certains neuropeptides : l'AVP est exprimé dans la partie dorso-médiane et le VIP dans la partie ventro-latérale (Abrahamson & Moore, 2001). Cette subdivision anatomique ne reflète pourtant pas une homogénéité de ces noyaux. D'un point de vue électrophysiologique, certains neurones épars présentent leur pic de potentiels d'action durant la nuit (Schaap *et al.*, 2003 ; Saeb-Parsy & Dyball, 2003), ce qui n'est pas le cas pour la majorité des autres neurones. Sur le plan moléculaire, certains neurones des SCN sont en antiphase pour l'expression des gènes horloge par rapport à la plupart des autres neurones, (Yamaguchi *et al.*, 2003). Les SCN représentent donc une structure hétérogène dont l'organisation est certainement plus complexe que celle qui leur est généralement attribuée avec la classique subdivision dorso-médiane/ventro-latérale. Ce niveau de complexité nous amène à considérer les SCN comme une structure très organisée, capable de contrôler très finement et indépendamment ses différentes sorties. Ce contrôle indépendant des sorties de l'horloge doit être cependant compatible avec la distribution générale du message circadien à l'ensemble de l'organisme. Une telle organisation suppose l'existence de deux ensembles au sein même de l'horloge. Un premier ensemble serait le mécanisme central de l'horloge oscillant de façon circadienne et synchronisable par l'environnement extérieur. Il serait constitué d'un réseau de neurones probablement liés entre eux et répartis dans l'ensemble des SCN. Cette répartition diffuse est étayée par le fait que des lésions partielles des SCN ne suppriment pas le rythme d'activité locomotrice (Pickard & Turek, 1985); de plus, seule l'intégrité de quelques cellules permet le maintien d'une organisation rythmique des animaux (Harrington *et al.*, 1993). Ce réseau central distribuerait l'information circadienne à un deuxième ensemble de neurones, lui-même constitué de différents sous-ensembles capables de gouverner indépendamment les différentes sorties de l'horloge. Comme pour le premier ensemble, ce deuxième ensemble pourrait être dispersé dans l'ensemble des SCN sans pour autant respecter les subdivisions traditionnellement attribuées à ces noyaux. Dans ce modèle, il ne faut cependant pas exclure la possibilité pour certains neurones, d'être impliqués à la fois dans le premier et le deuxième ensemble.



Si l'on utilise ce modèle pour interpréter les résultats que nous avons obtenus, en ce qui concerne l'injection ponctuelle de mélatonine à ZT12, nous pouvons en déduire qu'elle affecterait en premier lieu un (ou des) élément(s) du second ensemble, alors qu'elle n'aurait (peu ou pas) d'effet sur le premier ensemble. L'effet sur le second ensemble, engendrerait des modifications de l'amplitude de la sécrétion de mélatonine endogène sans pour autant affecter le profil de sécrétion de corticostérone. Ainsi, la sécrétion de corticostérone serait sous le contrôle d'un élément du second ensemble insensible à l'application de la mélatonine. Il a cependant été montré qu'une telle application de mélatonine, répétée quotidiennement, est capable de synchroniser des animaux placés en DD (Pitrosky *et al.*, 1999). Ces résultats montreraient que ce mode d'application de la mélatonine est aussi capable d'agir sur le premier ensemble de l'horloge, soit de façon directe, soit de façon indirecte, *via* une projection de neurones du second ensemble sur des neurones du premier ensemble. En ce qui concerne l'influence de photopériodes différentes, Nous pouvons considérer que dans ce cas, c'est le premier ensemble qui serait affecté, ce qui engendrerait des variations équivalentes (même décalages de phase) pour l'ensemble des sorties de l'horloge. Du point de vue expérimental, nous constatons que les caractéristiques de la sécrétion de mélatonine, de la sécrétion de corticostérone et de l'activité locomotrice varient dans le même sens lorsque la photopériode varie. De plus, ce phénomène peut être généralisé, au moins à deux espèces, dans la mesure où des résultats similaires ont été obtenus, aussi bien chez le rat, que chez l'*Arvicanthis*.

## **F. Perspectives**

### **Variations photopériodiques de l'activité générale chez l'Arvicanthis**

Techniquement les résultats concernant l'activité locomotrice chez l'Arvicanthis ont été obtenus grâce à l'enregistrement du nombre de tours de roue. Or chez cet animal, l'activité de roue ne reflète pas exactement l'activité locomotrice générale (Challet *et al.*, 2002). Pour compléter et finaliser ce travail chez l'Arvicanthis, il sera nécessaire d'étudier en parallèle son activité générale et le profil de sécrétion de corticostérone, lorsque cet animal est soumis aux différentes photopériodes.

### **Effet de l'application ponctuelle de mélatonine (à ZT12) chez l'Arvicanthis**

L'application de mélatonine exogène à la transition jour/nuit induit une augmentation durable de l'amplitude de la sécrétion de cette hormone par la glande pinéale (Bothorel *et al.*, 2002). Ce résultat, confirmé dans notre étude, chez le rat, a également été observé chez l'homme (Zaidan *et al.*, 1994). Nous avons utilisé l'Arvicanthis comme second modèle pour tester l'effet de la photopériode, mais il serait intéressant de voir s'il existe une telle augmentation d'amplitude de la sécrétion de mélatonine en réponse à l'application de mélatonine exogène chez cette espèce. L'approche devra se faire par une autre technique que celle de microdialyse transpinéale, cette technique n'étant pas adaptée pour l'Arvicanthis dont la glande pinéale présente une anatomie particulière (glande plate et non compacte).

### **Effet du changement de photopériode chez l'Arvicanthis sur l'expression des gènes horloge dans les SCN**

La variation de la durée de la photopériode affecte l'expression des gènes horloge dans les SCN de différentes espèces (Messenger *et al.*, 1999; 2000; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000; Steinlechner *et al.*, 2002; Tournier *et al.*, 2003), mais cette étude n'a jamais été réalisée chez l'Arvicanthis. Il est probable que l'expression de ces gènes horloge soit affectée chez cette espèce, mais il convient de le démontrer. Une telle étude pourrait alors mettre en évidence ce qui différencie les espèces nocturnes des espèces diurnes, pour l'intégration de la photopériode par les SCN.

## **Genèse du rythme de sécrétion de corticostérone**

La sécrétion de mélatonine est contrôlée par les SCN en réponse à la combinaison de deux signaux, l'un inhibiteur qui est la libération diurne de GABA et l'autre excitateur qui est la libération nocturne de glutamate (Perreau-Lenz *et al.*, 2004). De la même façon, la sécrétion de corticostérone est contrôlée par l'horloge grâce à un signal inhibiteur, la libération d'AVP et à un signal excitateur non encore identifié mais certainement libéré dans les PVN (Kalsbeek *et al.*, 1996b). Les identifications de ce facteur et de son récepteur cible, seraient possibles grâce à l'application de différents agonistes et antagonistes dans les PVN, à différents moments de la journée et à l'étude ces effets sur la sécrétion de corticostérone. Les études préliminaires menées au laboratoire montrent que la nature des signaux contrôlant le rythme de sécrétion de corticostérone serait différente selon l'espèce considérée, en particulier lorsque nous comparons le rat et l'*Arvicanthis*. Ces deux espèces ont de plus des profils de sécrétion différents : sécrétion bimodale chez l'*Arvicanthis*. Il serait donc intéressant de continuer d'étudier le contrôle des rythmes de sécrétion de corticostérone chez ces deux espèces.

## **Contrôle des variations photopériodiques des glucocorticoïdes par l'horloge**

Nous avons montré, chez l'*Arvicanthis* comme chez le rat, que la sécrétion de corticostérone variait (en phase et en durée) en fonction de la durée de la photopériode. Il est clair que l'horloge circadienne est à l'origine de ces variations, mais la question se pose à présent de savoir par quel moyen l'horloge « pilote » les variations photopériodiques de cette sécrétion. Il est connu que l'horloge contrôle la sécrétion de corticostérone par un message nerveux ( Kalsbeek *et al.*, 1996b ; par l'AVP et un signal excitateur encore inconnu), mais il reste à démontrer si ces signaux peuvent varier en fonction de la photopériode. D'autre part, l'horloge pourrait aussi contrôler les variations photopériodiques de la sécrétion de corticostérone par une voie endocrine. Il est alors fort probable que l'hormone impliquée soit la mélatonine, dans la mesure où elle est connue pour véhiculer l'information photopériodique journalière et saisonnière (voir § A.2.5. et A.2.6.). Pour tester cette hypothèse, il serait nécessaire d'effectuer une pinéalectomie chez des animaux et de les placer ensuite soit en photopériode courte, soit en photopériode longue. Après une période d'adaptation à ces nouvelles photopériodes, il conviendrait d'étudier les profils de sécrétion de corticostérone en l'absence de sécrétion rythmique de mélatonine. Dans cette démarche visant à tester l'effet de

la sécrétion endogène de mélatonine sur la sécrétion de corticostérone, nous disposons d'ores et déjà d'un élément de réponse, en ce qui concerne l'augmentation d'amplitude de la sécrétion de mélatonine due à l'application de mélatonine exogène à ZT12 puisque cette dernière n'a eu aucun effet sur la sécrétion de corticostérone (voir § D.1.). Il reste donc à tester l'effet de la phase ou de la durée de cette sécrétion de mélatonine endogène sur la sécrétion de corticostérone.

## **Rétroaction des glucocorticoïdes sur l'horloge**

Comme pour la perfusion journalière de mélatonine, il a été montré chez le rat maintenu en DD que l'administration quotidienne de glucocorticoïdes peut entraîner à une période de 24 heures, l'activité locomotrice qui était auparavant en libre cours (Horseman & Ehret, 1982). On peut en déduire que les glucocorticoïdes représentent pour l'horloge un réel *Zeitgeber*. Et pourtant, les SCN ne présentent que peu voire pas de récepteurs aux glucocorticoïdes (Fuxe *et al.*, 1985 ; Ahima & Harlan, 1990 ; Cintra *et al.*, 1994 ; Morimoto *et al.*, 1996). Ce qui suppose l'existence d'un intermédiaire sensible aux glucocorticoïdes et capable de transmettre cette information aux SCN. Le système sérotoninergique pourrait être cet intermédiaire. En effet, il est fort probable que les glucocorticoïdes permettent l'établissement d'un rythme de libération de sérotonine dans les SCN, et ceci par l'induction d'un rythme de transcription de la tryptophane hydroxylase dans le noyau du raphé médian (Malek *et al.*, communication personnelle). Ce noyau envoie des projections sérotoninergiques aux SCN. Par ailleurs, l'application d'un agoniste des récepteurs 5HT<sub>1A/7</sub>, le 8OH-DPAT (8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tétraline) est capable d'entraîner des décalages de phase de l'activité locomotrice (Smale *et al.*, 1990 ; Cutrera *et al.*, 1994b). Pour tester notre hypothèse, il faudrait voir si des animaux ayant subi une lésion des afférences sérotoninergiques par application de 5,7-DHT dans les SCN, sont encore capables d'être entraînés à 24 heures, par l'infusion journalière de glucocorticoïdes.

## **Conséquences des variations photopériodiques des glucocorticoïdes**

Dans la mesure où la sécrétion de corticostérone est saisonnière, elle peut être considérée comme utilisable par l'horloge pour imprimer l'information photopériodique à l'ensemble de l'organisme. Nous savons que les récepteurs des glucocorticoïdes sont exprimés dans de nombreuses structures aussi bien centrales que périphériques (Mc Gimsey *et al.*, 1991), ce qui suppose l'existence d'un grand nombre de cibles potentielles de ce signal à

la fois nyctéméral et photopériodique. Parmi ces cibles, deux structures font l'objet d'une attention particulière, il s'agit d'un organe périphérique qui est le foie et d'une structure limbique qui est l'amygdale centrale.

Dans le foie, il y a une densité très importante de récepteurs aux glucocorticoïdes. Ainsi, le foie est un organe intéressant pour étudier l'effet des variations saisonnières de la sécrétion des glucocorticoïdes aussi bien du point de vue moléculaire que physiologique. En effet, l'expression des gènes horloge dans cet organe est contrôlée par les SCN *via* un message humoral (Guo *et al.*, 2005) qui pourrait être la sécrétion des glucocorticoïdes (Balsalobre *et al.*, 2000). Il a été montré dans le foie du hamster doré que l'expression des gènes horloge varie avec la durée de la photopériode (Carr *et al.*, 2003). Il serait intéressant de voir si une surrénalectomie affecte ces gènes tant du point de vue de la rythmicité photopériodique que circadienne. Quant aux effets physiologiques des variations saisonnières de la sécrétion des glucocorticoïdes sur le foie, il serait intéressant de voir dans quelle mesure ces variations affecteraient la néoglucogénèse et pourraient ainsi contribuer à l'établissement d'un éventuel rythme saisonnier du taux sanguin de glucose.

Nous avons vu que l'amygdale centrale était une structure limbique intéressante puisque la sécrétion rythmique des glucocorticoïdes y induit une rythmicité de l'expression du gène horloge *Per2* (Lamont *et al.*, 2005). Dans la mesure où il existe des variations photopériodiques de cette sécrétion, la question se pose de savoir si ces variations retentissent sur l'expression des gènes horloge dans cette structure amygdalienne. Par ailleurs, connaissant le rôle important joué par cette structure limbique dans les processus émotionnels, on peut se demander s'il existe une relation plus ou moins étroite entre ce contrôle émotionnel et une pathologie particulière, liée aux phénomènes saisonniers telle que la dépression saisonnière.

## G. RÉFÉRENCES

### A

Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916:172-191.

Ahima RS, Harlan RE (1990) Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39:579-604.

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.* 22:1693-1703.

Albers HE, Liou SY, Stopa EG, Zoeller RT (1991) Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J. Neurosci.* 11:846-851.

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

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* 16:100-104.

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.* 12:1130-1133.

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.* 15:886-893.

Amir S, Lamont EW, Robinson B, Stewart J (2004) A circadian rhythm in the expression of *PERIOD2* protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.* 24:781-790.

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* 89:655-667.

Arendt J (1997) Safety of melatonin in long-term use (?) *J. Biol. Rhythms* 12:673-681.

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* 143:4165-4171.

Armstrong SM, Chesworth MJ (1987) Melatonin phase-shifts a mammalian circadian clock. In : *Fundamentals and Clinics in Pineal Research*, (Trentini GP, De Gaetani

C, and Pévet P, eds.), vol. 44, pp. 195-198, Raven Press, New York.

**Aschoff J, Pohl H (1978) Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften* 65:80-84.**

Axelrod J (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184:1341-1348.

### B

Bae HH, Mangels RA, Cho BS, Dark J, Yellon SM, Zucker I (1999) Ventromedial hypothalamic mediation of photoperiodic gonadal responses in male Syrian hamsters. *J. Biol. Rhythms* 14:391-401.

Baler R, Covington S, Klein DC (1997) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem.* 272:6979-6985.

Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937.

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* 289:2344-2347.

Barassin S, Saboureau M, Kalsbeek A, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, Buijs RM, Guardiola-Lemaitre B, Pevet P (1999) Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J. Pineal Res.* 27:193-201.

Bartness TJ, Song CK, Demas GE (2001) SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J. Biol. Rhythms* 16:196-204.

Benveniste H, Hansen AJ, Ottosen NS (1989) Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J. Neurochem.* 52:1741-1750.

Berg GR, Klein DC (1972) Norepinephrine increases the (<sup>32</sup>P)labelling of a specific phospholipid fraction of post-synaptic pineal membranes. *J. Neurochem.* 11:2519-2532.

Berson DM (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26:314-320.

Bitto L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N (1966) The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J. Neurochem.* 13:1057-1067.

Bobrzynska KJ, Mrosovsky N (1998) Phase shifting by novelty-induced running: activity dose-response curves at different circadian times. *Comp. Physiol.* 182:251-258.

Boissin J, Canguilhem B (1998) *Les rythmes du vivant : Origine et contrôle des rythmes biologiques*. Nathan/CNRS Editions, Paris, 320 pp.

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.* 16:1090-1098.

Bowers CW, Dahm LM, Zigmond RE (1984) The number and distribution of sympathetic neurons that innervate the rat pineal gland. *Neuroscience* 13:87-96.

Buijs RM, Pevet P (1980) Vasopressin- and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. *Cell Tissue Res.* 205:11-17.

Buijs RM, Kalsbeek A, van der Woude TP, van Heerikhuizen JJ, Shinn S (1993a) Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am. J. Physiol.* 264:R1186-R1192.

Buijs RM, Markman M, Nunes-Cardoso B, Hou YX, Shinn S (1993b) Projections of the suprachiasmatic nucleus to stress-related areas in the rat hypothalamus: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 335:42-54.

Buijs RM, Hou YX, Shinn S, Renaud LP (1994) Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 340:381-391.

Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuizen JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci.* 11:1535-1544.

Buijs RM, Chun SJ, Nijijima A, Romijn HJ, Nagai K (2001) Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J. Comp. Neurol.* 431:405-423.

Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:521-526.

## 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.* 24:179-184.

Cahill GG (1971) Actions of adrenal cortical steroids on carbohydrate metabolism. In: *The human adrenal cortex*. Christy, NP (ed), pp. 205-209. New York.

Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pevet P, Challet E (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 116:583-591.

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.* 252:307-315.

Card JP, Moore RY (1989) Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 284:135-147.

Carr AJ, Johnston JD, Semikhodskii AG, Nolan T, Cagampang FR, Stirland JA, Loudon AS (2003) Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr. Biol.* 13:1543-1548.

Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF (1987) The suprachiasmatic nuclei stimulate evening ACTH secretion in the rat. *Brain Res.* 423:173-178.

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284:760-765.

Cassone VM (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 13:457-464.

Cassone VM, Natesan AK (1997) Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J. Biol. Rhythms.* 12:489-497.

Castel M, Belenky M, Cohen S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1993) Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 5:368-381.

Cechetto DF, Saper CB (1988) Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 272:579-604.

Challet E, Pévet P, Malan A (1997) Effect of prolonged fasting and subsequent refeeding on free-running rhythms of temperature and locomotor activity in rats. *Behav. Brain Res.* 84:275-284.

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.

Challet E, Caldelas I, Graff C, Pevet P (2003) Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem.* 384:711-719.

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* 417:405-410.

Cheung PW, McCormack CE (1982) Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. *Am. J. Physiol.* 242:R261-R264.

Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* 267:1244-1252.

Cintra A, Bhatnagar M, Chadi G, Tinner B, Lindberg J, Gustafsson JA, Agnati LF, Fuxe K (1994) Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 746:42-61.

Ciriello J, Calaresu FR (1980) Role of paraventricular and supraoptic nuclei in central cardiovascular regulation in the cat. *Am. J. Physiol.* 239:R137-R142.

Claustrat B, Geoffriau M, Brun J, Chazot G (1996) Melatonin: from hormone to drug? *Pathol. Biol. (Paris)* 44:645-653.

Csaki A, Kocsis K, Halasz B, Kiss J (2000) Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [<sup>3</sup>H]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience* 101:637-655.

Cui LN, Coderre E, Renaud LP (2001) Glutamate and GABA mediate suprachiasmatic nucleus inputs to spinal-projecting paraventricular neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R1283-R1289.

Cutrer RA, Kalsbeek A, Pevet P (1994a) Specific destruction of the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei prevents triazolam-induced phase advances of hamster activity rhythms. *Behav. Brain Res.* 62:21-28.

Cutrer RA, Ouarour A, Pevet P (1994b) Effects of the 5-HT<sub>1a</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photoc stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neurosci. Lett.* 172:27-30.

## **D**

Daan S, Pittendrigh CS (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* 127:253-266.

Dardente H, Poirel VJ, Klosen P, Pevet P, Masson-Pevet M (2002) Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res.* 958:261-271.

Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosen P, Pevet P, Masson-Pevet M (2003) Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 114:101-106.

Dark JG, Asdourian D (1975) Entrainment of the rat's activity rhythm by cyclic light following lateral geniculate nucleus lesions. *Physiol. Behav.* 15:295-301.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19:269-301.

de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL (1995) The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport* 6:1715-1722.

Delgado JM, De Feudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 198:9-21.

de Reviere MM, Ravault JP, Tillet Y, Pelletier J (1989) Melatonin binding sites in the sheep pars tuberalis. *Neurosci. Lett.* 100:89-93.

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* 266:1713-1717.

Drijfhout WJ, Grol CJ, Westerink BH (1993) Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications. *J. Neurochem.* 61:936-942.

Drijfhout WJ, van der Linde AG, de Vries JB, Grol CJ, Westerink BH (1996) Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci. Lett.* 202:185-188.

Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML (1988) 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122:1825-1833.

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.* 32:181-186.

## **E**

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr. Rev.* 19:101-143.

Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM (2002) The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iε. *J. Biol. Chem.* 277:17248-17254.

Eranko O, Rechartt L, Eranko L, Cunningham A (1970) Light and electron microscopic histochemical observations on cholinesterase-containing sympathetic nerve fibres in the pineal body of the rat. *Histochem. J.* 6:479-489.

## **F**



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* 25:437-447.

Foster RG, Hankins MW (2002) Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog. Retin Eye Res.* 21:507-527.

Franchimont D (2004) Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024:124-137.

Fukuhara C, Shinohara K, Tominaga K, Otori Y, Inouye ST (1993) Endogenous circadian rhythmicity of somatostatin like-immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 606:28-35.

Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto E (2002) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J. Neurosci. Res.* 70:799-807.

Funabashi T, Shinohara K, Mitsushima D, Kimura F (2000a) Estrogen increases arginine-vasopressin V1a receptor mRNA in the preoptic area of young but not of middle-aged female rats. *Neurosci. Lett.* 285:205-208.

Funabashi T, Shinohara K, Mitsushima D, Kimura F (2000b) Gonadotropin-releasing hormone exhibits circadian rhythm in phase with arginine-vasopressin in co-cultures of the female rat preoptic area and suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12:521-528.

Fuxe K, Wikstrom AC, Okret S, Agnati LF, Harfstrand A, Yu ZY, Granholm L, Zoli M, Vale W, Gustafsson JA (1985) Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 117:1803-1812.

## 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* 105:721-729.

Garidou-Boof ML, Sicard B, Bothorel B, Pitrosky B, Ribelayga C, Simonneaux V, Pevet P, Vivien-Roels B (2005) Environmental control and adrenergic regulation of pineal activity in the diurnal tropical rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *J. Pineal Res.* 38:189-197.

Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P (1994) 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* 280:1564-1569.

Gilbey MP, Coote JH, Fleetwood-Walker S, Peterson DF (1982) The influence of the paraventriculo-spinal pathway, and oxytocin and vasopressin on sympathetic preganglionic neurones. *Brain Res.* 251:283-290.

Gomez F, Chapleur M, Fernet B, Burlet C, Nicolas JP, Burlet A (1997) Arginine vasopressin (AVP) depletion in neurons of the suprachiasmatic nuclei affects the AVP content of the paraventricular neurons and stimulates adrenocorticotrophic hormone release. *J. Neurosci. Res.* 50:565-574.

Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 12:1165.

Gower BA, Nagy TR, Stetson MH (1996) Influence of photoperiod, time, and sex on hormone concentrations in collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 101:53-62.

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.

Griffin EA Jr, Staknis D, Weitz CJ (1999) Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286:768-771.

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.* 102:3111-3116.

## H

Hannibal J (2002) Neurotransmitters of the retino-hypothalamic 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:RC191.

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.

Harmar AJ (2003) An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* 4:335-338.

Harrington ME, Nance DM, Rusak B (1985) Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Res. Bull.* 15:465-472.

- Harrington ME, Rusak B (1986) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 1:309-325.
- Harrington ME, Rahmani T, Lee CA (1993) Effects of damage to SCN neurons and efferent pathways on circadian activity rhythms of hamsters. *Brain Res. Bull.* 30:655-669.
- 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.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.
- 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.
- Hermes ML, Coderre EM, Buijs RM, Renaud LP (1996) GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J. Physiol.* 496:749-757.
- Hickey TL, Spear PD (1976) Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp. Brain Res.* 24:523-529.
- Hiebert SM, Salvante KG, Ramenofsky M, Wingfield JC (2000) Corticosterone and nocturnal torpor in the rufous hummingbird (*Selasphorus rufus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 120:220-234.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S (1974) In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249:1311-1313.
- Hisano S, Chikamori-Aoyama M, Katoh S, Kagotani Y, Daikoku S, Chihara K (1988) Suprachiasmatic nucleus neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide have synaptic contacts with axons immunoreactive for neuropeptide Y: an immunoelectron microscopic study in the rat. *Neurosci. Lett.* 88:145-150.
- 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.* 272:8581-8593.
- 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.* 95:5474-5479.
- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M (1998) Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:83-87.
- Honma S, Shirakawa T, Nakamura W, Honma K (2000) Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neurosci. Lett.* 294:113-116.
- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419:841-844.
- Hoorneman EM, Buijs RM (1982) Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 243:235-241.
- Horseman ND, Ehret CF (1982) Glucocorticosteroid injection is a circadian zeitgeber in the laboratory rat. *Am. J. Physiol.* 243:R373-R378.
- Huhman KL, Hennessey AC, Albers HE (1996) Rhythms of glutamic acid decarboxylase mRNA in the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 11:311-316.
- Humlova M, Illnerova H (1992) Entrainment of the circadian rhythm in the rat pineal N-acetyltransferase activity by melatonin is photoperiod dependent. *J. Pineal Res.* 13:151-157.
- ## I
- Ibata Y, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, Matsuda T, Munekawa K, Takamatsu T, Hisa Y, Shige-yoshi Y, Amaya F (1999) Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front. Neuroendocrinol.* 20:241-268.
- Illnerova H, Hoffman K, Vanecek J (1986) Adjustment of the rat pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod depends on the direction of the extension of the dark period. *Brain Res.* 362:403-408.
- 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.* 76:5962-5966.
- Isobe Y, Nishino H (1996) Vasoactive intestinal peptide and gastrin-releasing peptide play distinct roles in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Bull.* 40:287-290.
- Isobe Y, Nishino H (1998) AVP rhythm in the suprachiasmatic nucleus in relation to locomotor activity under constant light. *Peptides* 19:827-832.
- ## 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.* 887:472-476.

Jasper MS, Engeland WC (1994) Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* 59:97-109.

Jasper MS, Engeland WC (1997) Splanchnicotomy increases adrenal sensitivity to ACTH in nonstressed rats. *Am. J. Physiol.* 273:E363-E368.

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.

Johnson RF, Moore RY, Morin LP (1988) Running wheel activity in hamsters with hypothalamic damage. *Physiol. Behav.* 43:755-763.

Justice JB Jr (1993) Quantitative microdialysis of neurotransmitters. *J. Neurosci. Methods* 48:263-276.

## **K**

Kalsbeek A, Buijs RM (1992) Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. *Prog. Brain Res.* 92:321-333.

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.* 580:62-67.

Kalsbeek A, Buijs RM, Engelmann M, Wortjak CT, Landgraf R (1995) In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 682:75-82.

Kalsbeek A, van der Vliet J, Buijs RM (1996a) 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, van Heerikhuizen JJ, Wortel J, Buijs RM (1996b) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J. Neurosci.* 16:5555-5565.

Kalsbeek A, Drijfhout WJ, Westerink BH, van Heerikhuizen JJ, van der Woude TP, van der Vliet J, Buijs RM (1996c) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release. *Neuroendocrinology* 63:69-78.

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* 91:453-461.

Kalsbeek A, Fliers E, Franke AN, Wortel J, Buijs RM (2000) Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as

revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology* 141:3832-3841.

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.* 9:3146-3154.

Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309:109-118

Kaneko M, Kaneko K, Shinsako J, Dallman MF (1981) Adrenal sensitivity to adrenocorticotropin varies diurnally. *Endocrinology* 109:70-75.

Kasa P, Dobo E, Wolff JR (1991) Cholinergic innervation of the mouse superior cervical ganglion: light- and electron-microscopic immunocytochemistry for choline acetyltransferase. *Cell Tissue Res.* 265:151-158.

Keller-Wood ME, Dallman MF (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* 5:1-24.

Kiss JZ, Palkovits M, Zaborszky L, Tribollet E, Szabo D, Makara GB (1983) Quantitative histological studies on the hypothalamic paraventricular nucleus in rats: I. Number of cells and synaptic boutons. *Brain Res.* 262:217-224.

Kissinger PT, Hart JB, Adams RN (1973) Voltammetry in brain tissue - a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 55:209-213.

Kjaer A (1993) Vasopressin as a neuroendocrine regulator of anterior pituitary hormone secretion. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 129:489-496.

Klein DC, Buda MJ, Kapoor CL, Krishna G (1978) Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science* 199:309-311.

Klein DC, Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174:245-262.

Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In : *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. Ciba Foundation Symposium 117*, (Everet D and Clarke D, eds.), pp. 38-56, Pitman, London.

Konopka RJ, Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:2112-2116.

Korf HW, Moller M, Gery I, Zigler JS, Klein DC (1985) Immunocytochemical demonstration of retinal S-antigen in the pineal organ of four mammalian species. *Cell Tissue Res.* 239:81-85.

Korf HW (1996) Innervation of the pineal gland. In : *The Autonomic Nervous System : Autonomic-Endocrine*

*Interactions*, (Unsicker K, ed.), vol. 10, pp. 129-180, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Korf HW, Schomerus C, Stehle JH (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 146:1-100.

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* 294:2511-2515.

Kuhlman SJ, Silver R, Le Sauter J, Bult-Ito A, McMahon DG (2003) Phase resetting light pulses induce *Per1* and persistent spike activity in a subpopulation of biological clock neurons. *J. Neurosci.* 23:1441-1450.

Kuhlman SJ, McMahon DG (2004) Rhythmic regulation of membrane potential and potassium current persists in SCN neurons in the absence of environmental input. *Eur. J. Neurosci.* 20:1113-1117.

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.

## L

Lamont EW, Robinson B, Stewart J, Amir S (2005) The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein *Period2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:4180-4184.

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.* 27:342-346.

Larsen PJ (1999) Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc. Res. Tech.* 46:296-304.

Leander P, Vrang N, Moller M (1998) Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Neurol.* 399:73-93.

Leak RK, Card JP, Moore RY (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transsynaptic transport. *Brain Res.* 819:23-32.

Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855-867.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y (1960) Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* 235:1992-1997.

LeSauter J, Silver R (1998) Output signals of the SCN. *Chronobiol. Int.* 15:535-550.

Lin HS, Hwang BH, Tseng CY (1975) Fine structural changes in the hamster pineal gland after blinding and superior cervical ganglionectomy. *Cell Tissue Res.* 158:285-299.

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.* 6:251-260.

Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg D (2003) Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* 15:390-397.

Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19:91-102.

Liu C, Reppert SM (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25:123-128.

Long MA, Jutras MJ, Connors BW, Burwell RD (2005) Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.* 8:61-66.

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.

## M

Majsa Z, Peczely P (1976) Seasonal rhythm in the hypothalamo-hypophyseal-adrenal function of the chicken. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 47:111-115.

Malpaux 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* 16:336-347.

Malpaux B, Tricoire H, Mailliet F, Daveau A, Migaud M, Skinner DC, Pelletier J, Chemineau P (2002) Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl.* 167-179.

Marchant EG, Mistlberger RE (1995) Morphine phase-shifts circadian rhythms in mice: role of behavioural activation. *Neuroreport* 7:209-212.

Maronde E, Wicht H, Tasken K, Genieser HG, Dehghani F, Olcese J, Korf HW (1999) CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J. Pineal Res.* 27:170-182.

- Masana MI, Dubocovich ML (2001) Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci. Stke* 107:PE39.
- May V, Beaudet MM, Parsons RL, Hardwick JC, Gauthier EA, Durda JP, Braas KM (1998) Mechanisms of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-induced depolarization of sympathetic superior cervical ganglion (SCG) neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865:164-175.
- 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* 136:144-153.
- Maywood ES, Bittman EL, Hastings MH (1996) Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol. Reprod.* 54:470-477.
- 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.* 96:15211-15216.
- Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH (2003) Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* 15:329-334.
- McArthur AJ, Gillette MU, Prosser RA (1991) Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 565:158-161.
- McGimsey WC, Cidowski JA, Stumpf WE, Sar M (1991) Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology* 129:3064-3072.
- Meijer JH, Rietveld WJ (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69:671-707.
- 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.* 96:9938-9943.
- 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.* 12:2865-2870.
- Mikkelsen JD, Larsen PJ, O'Hare MM, Wiegand SJ (1991) Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience* 40:55-66.
- Mikkelsen JD, Panula P, Moller M (1992) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat pineal gland: evidence for a histaminergic central innervation. *Brain Res.* 597:200-208.
- Mikkelsen JD, Fahrenkrug J (1994) Concentrations and distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP), peptide histidine isoleucine (PHI) and peptide histidine valine (PHV) in the cerebral cortex and the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Brain Res.* 656:95-107.
- Mikkelsen JD, Hauser F, deLecea L, Sutcliffe JG, Kilduff TS, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V (2001) Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *Eur. J. Neurosci.* 14:419-425.
- Mistlberger RE (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:171-195.
- Moller M, Korf HW (1983) Central innervation of the pineal organ of the Mongolian gerbil. A histochemical and lesion study. *Cell Tissue Res.* 230:259-272.
- Moller M, Liu W (1999) Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia. A retrograde in vivo neuronal tracing study. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:345-353.
- Moore RY, Klein DC (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71:17-33.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201-206.
- Moore RY, Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150:112-116.
- Moore RY (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog. Brain Res.* 111:103-119.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26:235-269.
- Morin LP, Blanchard J, Moore RY (1992) Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis. Neurosci.* 8:219-230.
- 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-R994.

## **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.

Nakamura W, Honma S, Shirakawa T, Honma K (2001) Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 14:666-674.

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

Nisikawa Y, Shimazoe T, Shibata S, Watanabe S (1998) N-methyl-D-aspartate receptors are indispensable for the formation of long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 782:303-305.

Nisikawa Y, Shimazoe T, Shibata S, Watanabe S (2002) Time-dependent effect of glutamate on long-term potentiation in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 90:201-204.

Noguchi T, Watanabe K (2005) Tetrodotoxin resets the clock. *Eur. J. Neurosci.* 21:3361-3367.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangre P, Canet E, Boutin JA (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275:31311-31317.

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.* 12:2856-2864.

## **O**

Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8:267-269.

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.

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.* 181:165-168.

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* 286:2531-2534.

Ostrowski NL, Lolait SJ, Young WS (1994) Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* 135:1511-1528.

## **P**

Palm IF, Van Der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A (1999) Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 93:659-666.

Palm IF, van der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A (2001) The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. *Brain Res.* 901:109-116.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307-320.

Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298:2213-2216.

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* 301:525-527.

Pando MP, Morse D, Cermakian N, Sassone-Corsi P (2002) Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* 110:107-117.

Pazo D, Cardinali DP, Cano P, Reyes Toso CA, Esquifino AI (2002) Age-related changes in 24-hour rhythms of norepinephrine content and serotonin turnover in rat pineal gland: effect of melatonin treatment. *Neurosignals* 11:81-87.

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.* 17:221-228.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Pevet P, Buijs RM (2004) Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur. J. Neurosci.* 19:318-324.

Pévet P, Masson-Pévet M., Vivien-Roels B, Bonn D (1986) Photoperiod, temperature, melatonin, 5-methoxytryptamine and seasonal reproduction: some data on the golden hamster. In : *Advances in Pineal Research*, (Reiter RJ and Karasek M, eds.), vol. 1, pp. 185-195, John Libbey & Co Ltd, London.

Pévet P (1999) Melatonin and biological rhythms. *Thérapie* 53:411-420.

Pévet P (2000) Melatonin and biological rhythms. *Biol. Signals Recept.* 9:203-212.

Pévet P, Bothorel B, Slotten H, Saboureau M (2002) The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res.* 309:183-191.

Pickard GE, Turek FW (1985) Effects of partial destructions of the suprachiasmatic nuclei on two circadian parameters wheel running activity and short-days induced testicular regression. *J. Comp. Physiol.* 156:803-815

Pickard GE, Ralph MR, Menaker M (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 2:35-56.

Pitrosky B, Kirsch R, Malan A, Mocaer E, Pévet P (1999) Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol.* 277:R812-R828.

Pittendrigh CS (1981) Circadian system entrainment. In : *Handbook of Behavioural Physiology, Biological rhythms*, (Aschoff J, ed.), vol. 4, pp. 95-124, Plenum Press, New York.

Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632-1635.

Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pévet P, Masson-Pévet 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* 120:745-755.

Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-260.

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.* 95:340-345.

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* 6871:493.

## Q

Quay WB (1962) Experimental and cytological studies of pineal cells staining with acid hematein in the rat (*Rattus norvegicus*). *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 5:87-100.

Quintero JE, Kuhlman SJ, McMahon DG (2003) The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J. Neurosci.* 23:8070-8076.

## R

Rajaratnam SM, Arendt J (2001) Health in a 24-h society. *Lancet* 9286:999-1005.

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.

Ralph MR, Menaker M (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225-1227.

Redlin U, Lynch GR (1997) Effects of pinealectomy on SCN electrical firing rhythm in Djungarian hamsters. *Neurosci. Lett.* 236:67-70.

Redman J, Armstrong S, Ng KT (1983) Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219:1089-1091.

Reebs SG, Mrosovsky N (1989) Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve. *J. Biol. Rhythms* 4:39-48.

Reiter RJ (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* 1:109-131.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slauchaupt 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.* 92:8734-8738.

Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.

Reuss S, Johnson RF, Morin LP, Moore RY (1989) Localization of spinal cord preganglionic neurons innervating the superior cervical ganglion in the golden hamster. *Brain Res. Bull.* 22:289-293.

Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V (1997) Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* 777:247-250.

Ribelayga C, Gauer F, Pévet P, Simonneaux V (1998) Distribution of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA in the rat brain: an in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res.* 291:415-421.

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* 2:105-115.

Romijn HJ, Sluiter AA, Wortel J, Van Uum JF, Buijs RM (1998) Immunocytochemical evidence for a diurnal rhythm of neurons showing colocalization of VIP with GRP in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 391:397-405.

Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1984) Distribution of substance P neurons in the epithalamus of the rat: an immunohistochemical investigation. *J. Pineal Res.* 4:355-370.

Roseboom PH, Klein DC (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol. Pharmacol.* 47:439-449.

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* 298:2211-2213.

Rusak B, Morin LP (1976) Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. *Biol. Reprod.* 15:366-374.

## S

Saboureaux M, Laurent G, Boissin J (1979) Daily and seasonal rhythms of locomotor activity and adrenal function in male hedgehog (*Erinaceus europaeus* L.). *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 10:249-266.

Saboureaux M, Bobet JP, Boissin J (1980) Activité cyclique de la fonction corticosurrénalienne et variations saisonnières du métabolisme périphérique du cortisol chez un mammifère hibernant, le hérisson (*Erinaceus europaeus* L.). *J. Physiol., Paris* 76:617-629.

Saeb-Parsy K, Dyball RE (2003) Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J. Biol. Rhythms* 18:26-42.

Sage D, Maurel D, Bosler O (2002) Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensitivity to ACTH. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E458-E465.

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.* 277:267-271.

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* 43:527-537.

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.* 100:15994-15999.

Schneider T, Semm P, Vollrath L (1981) Ultrastructural observations on the central innervation of the guinea-pig pineal gland. *Cell Tissue Res.* 220:41-49.

Schuhler S, Pitrosky B, Kirsch R, Pévet P (2002) Entrainment of locomotor activity rhythm in

pinelectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behav. Brain Res.* 133:343-350.

Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:1694-1698.

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* 16:302-311.

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* 19:1261-1269.

Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288:1013-1019.

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.* 247:154-158.

Shibata S, Cassone VM, Moore RY (1989) Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.* 97:140-144.

Shibata S, Moore RY (1993) Tetrodotoxin does not affect circadian rhythms in neuronal activity and metabolism in rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 606:259-266.

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:R360-R364.

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* 91:1043-1053.

Shinohara K, Isobe Y, Takeuchi J, Inouye ST (1991) Circadian rhythms of somatostatin-immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 129:59-62.

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.

Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I (1986) Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and



- neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci. Lett.* 70:187-192.
- 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, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-813.
- Slotten HA, Krekling S, Sicard B, Pévet P (2002) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicantis ansorgei*. *Behav. Brain Res.* 133:11-19.
- Smale L, Michels KM, Moore RY, Morin LP (1990) Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res.* 515:9-19.
- Sodersten P, Henning M, Melin P, Ludin S (1983) Vasopressin alters female sexual behaviour by acting on the brain independently of alterations in blood pressure. *Nature* 301:608-610.
- Sodersten P, De Vries GJ, Buijs RM, Melin P (1985) A daily rhythm in behavioral vasopressin sensitivity and brain vasopressin concentrations. *Neurosci. Lett.* 58:37-41.
- Somers RL, Klein DC (1984) Rhodopsin kinase activity in the mammalian pineal gland and other tissues. *Science* 226:182-184.
- 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.* 460:229-232.
- Stehle JH, 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.* 78:173-177.
- Stehle JH, von Gall C, Korf HW (2001) Analysis of cell signalling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *Eur. J. Neurosci.* 14:1-9.
- 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* 17:202-209.
- 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.* 69:1583-1586.
- Strack AM, Sawyer WB, Marubio LM, Loewy AD (1988) Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res.* 455:187-191.
- Sugden D, Klein DC (1985) Regulation of rat pineal alpha 1-adrenoceptors. *J. Neurochem.* 44:63-67.
- 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.* 13:664-668.
- 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* 18:134-144.
- Sumova A, Bendova Z, Sladek M, Kovacikova Z, Illnerova H (2004) Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol. Res.* 53:S167-S176.
- Sun X, Liu T, Deng J, Borjigin J (2003). Long-term in vivo pineal microdialysis. *J. Pineal Res.* 35:118-124.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90:1003-1011.
- Swaab DF, Pool CW, Nijveldt F (1975) Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *J. Neural Transm.* 36:195-215.
- Swanson LW, Sawchenko PE (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* 6:269-324.
- Szafarczyk A., Ixart G, Alonso G, Malaval F, Nouguiersoule J, Assenmacher I (1981) Neural control of circadian rhythms in plasma ACTH, plasma corticosterone and motor activity. *J. Physiol. (Paris)*. 77:969-976.

## T

- Tanaka M, Ichitani Y, Okamura H, Tanaka Y, Ibata Y (1993) The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res. Bull.* 31:637-640.
- 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.* 20:7525-7530.
- Teclerariam-Mesbah R, Kalsbeek A, Pévet P, Buijs RM (1997a) Direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection from the suprachiasmatic nucleus to spinal projecting hypothalamic paraventricular neurons. *Brain Res.* 748:71-76.
- Teclerariam-Mesbah R, Kalsbeek A, Buijs RM, Pévet P (1997b) Oxytocin innervation of spinal preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion in the rat. *Cell Tissue Res.* 287:481-486.
- Teclerariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM (1999) Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J. Comp. Neurol.* 406:171-182.

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* 389:512-516.

Thomas EM, Armstrong SM (1988) Melatonin administration entrains female rat activity rhythms in constant darkness but not in constant light. *Am. J. Physiol.* 255:R237-R242.

Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pevet M, Pevet P, Vuillez P (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118:317-322.

Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B (2002) Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143:84-90.

Tricoire H, Moller M, Chemineau P, Malpoux B (2003) Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *J. Reprod. Suppl.* 61:311-321.

Tritschler L, Saboureau M, Pevet P, Bothorel B (2005) A functional subdivision of the circadian clock is revealed by differential effects of melatonin administration. *Neurosci. Lett.* (*In press*).

## 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* 418:534-539.

## V

van den Pol AN (1991) Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *J. Neurosci.* 11:2087-2101.

van den Pol AN, Tsujimoto KL (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15:1049-1086.

van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM (1993) Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* 2:137-144.

Van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, Van den Hurk R, Buijs RM (1997) Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Comp. Neurol.* 384:569-579.

Vandesande F, Dierickx K, DeMey J (1975) Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res.* 156:377-380.

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 Reeth O, Turek FW (1989) Administering triazolam on a circadian basis entrains the activity rhythm of hamsters. *Am. J. Physiol.* 256:R639-R645.

Verhagen LA, Pévet P, Saboureau M, Sicard B, Nesme B, Claustrat B, Buijs RM, Kalsbeek A (2003) Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Res.* 995:197-204.

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* 264:719-725.

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.* 1040:508-511.

Vrang N, Larsen PJ, Mikkelsen JD (1995) Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tract tracing. *Brain Res.* 684:61-69.

## W

Walker RF, Aloyo VJ (1987) Molecular mechanisms controlling norepinephrine-mediated release of serotonin from rat pineal glands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 221:223-236.

Watson RE Jr, Langub MC Jr, Engle MG, Maley BE (1995) Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Res.* 689:254-264.

Weibel L, Follenius M, Spiegel K, Ehrhart J, Brandenberger G (1995) Comparative effect of night and daytime sleep on the 24-hour cortisol secretory profile. *Sleep.* 18:549-556.

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, Reppert SM (1996) Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 706:30-36.

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.* 14:2289-2295.

Williams LM, Morgan PJ (1988) Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* 119:R1-R3.

Wollnik F (1989) Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Lab. Anim.* 23:107-125.

Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, Landgraf R (1996) Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *J. Neurosci.* 16:7725-7732.

Wurtman RJ, Anton-Tay F (1969) The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog. Horm. Res.* 25:493-522.

## X

## Y

Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 292:278-281.

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.* 21:1301-1314.

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of

cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408-1412.

Yamamoto K, Senba E, Matsunaga T, Tohyama M (1989) Calcitonin gene-related peptide containing sympathetic preganglionic and sensory neurons projecting to the superior cervical ganglion of the rat. *Brain Res.* 487:158-164.

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* 288:682-685.

Yamazaki S, Alones V, Menaker M (2002) Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. *J. Biol. Rhythms* 17:315-329.

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.* 101:5339-5346.

Yu HS, Tsin ATC, Reiter RJ (1993). Melatonin: history, biosynthesis, and assay methodology. In : *Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications*, (Yu HS, Reiter RJ, eds.), pp. 1-16, CRC Press, Boca Raton, Florida.

## Z

Zaidan R, Geoffriau M, Brun J, Taillard J, Bureau C, Chazot G, Claustrat B (1994) Melatonin is able to influence its secretion in humans: description of a phase-response curve. *Neuroendocrinology* 60:105-112.

Zhang ET, Mikkelsen JD, Moller M (1991) Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res.* 265:63-71.

## Résumé

Chez les Mammifères, l'horloge circadienne principale est située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN). Cette horloge délivre une information rythmique à l'ensemble de l'organisme, au travers de nombreuses fonctions hormonales (telles que la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale ou la sécrétion de corticostérone par la glande surrénale) et comportementales (telle que l'activité locomotrice). Ces différents rythmes, appelés « sorties » de l'horloge, ont fait l'objet de notre étude pour apprécier le fonctionnement de l'horloge circadienne, en réponse à deux stimulations connues pour l'affecter, à savoir 1) l'application d'une dose pharmacologique de mélatonine à la transition jour/nuit et 2) le changement de la durée de la photopériode. Nous avons utilisé deux rongeurs, l'un nocturne, le Rat, et l'autre diurne, l'*Arvicanthis*, qui tous deux sécrètent de la corticostérone mesurable par microdialyse intracérébrale.

Chez le rat, l'injection sous-cutanée de mélatonine exogène à la transition jour/nuit a induit une augmentation significative de l'amplitude (pratiquement doublée) de la sécrétion de la mélatonine endogène par la glande pinéale et cette augmentation est aussi durable (pendant au moins deux jours après l'injection). Par contre, cette injection de mélatonine exogène n'affecte pas le profil de sécrétion de corticostérone. Ces effets différentiels de la mélatonine exogène montrent qu'elle n'affecte qu'un élément de l'horloge responsable spécifiquement du contrôle de la sécrétion de mélatonine, sans pour cela affecter un autre élément qui lui, serait responsable du contrôle de la sécrétion de corticostérone. Ceci montre clairement l'existence d'une subdivision fonctionnelle de l'horloge.

En ce qui concerne le changement de la durée de la photopériode, des rats ont été soumis pendant sept à huit semaines à l'une des trois photopériodes : 16 heures de lumière - 8 heures d'obscurité (LD 16:8), LD 12:12 et LD 8:16 et les profils des trois « sorties » ont alors été mesurés et analysés. Ainsi, par rapport à la transition jour/nuit prise comme référence, le pic nocturne de sécrétion de mélatonine apparaît de plus en plus tardivement lorsque la durée de la nuit augmente. La même observation a été faite pour la sécrétion de corticostérone : en photopériode longue, le pic est situé à la transition jour/nuit, tandis qu'en photopériode courte il apparaît au milieu de la nuit. De la même façon, le pic d'activité locomotrice générale de ces rats se décale aussi de plus en plus vers la fin de la nuit lorsque sa durée augmente.

Des *Arvicanthis* ont également été placés pendant sept à huit semaines, en photopériode longue (LD 16:8) ou courte (LD 8:16). Chez ces animaux, les profils de sécrétion de corticostérone présentent deux pics situés aux transitions jour/nuit et nuit/jour pour les deux photopériodes testées. Placés ensuite dans une cage équipée d'une roue, les animaux ont présenté une activité locomotrice avec deux pics situés à ces mêmes transitions. Ainsi, chez l'*Arvicanthis* comme chez le rat, la sécrétion de corticostérone varie en fonction de la photopériode. Cette sécrétion endocrine peut donc être considérée, au même titre que la mélatonine, comme une sortie saisonnière de l'horloge. De plus, chez ces deux espèces, les décalages de phases observés avec les changements de photopériode sont identiques pour les trois sorties de l'horloge étudiées, montrant ainsi que l'horloge est affectée de façon globale par les variations photopériodiques.

L'application de mélatonine exogène à la transition jour/nuit a un effet spécifique sur la sécrétion de mélatonine endogène. Le changement de photopériode montre un effet plus global sur l'horloge et cet effet retentit de façon équivalente sur au moins trois de ses sorties. Ces différents résultats nous ont permis de proposer un nouveau modèle de l'organisation fonctionnelle de l'horloge, laquelle serait constituée de deux ensembles de neurones. Le premier ensemble représenterait le mécanisme central de l'horloge, alors que le second ensemble contrôlé par le premier, serait lui-même constitué de sous-ensembles pouvant régir chacun une sortie de l'horloge. Dans ce modèle, l'application de mélatonine à la transition jour/nuit n'affecte que le sous-ensemble responsable de la sécrétion de mélatonine. Par contre, la variation de la photopériode affecte le premier ensemble et retentit donc, de façon équivalente, sur plusieurs sorties de l'horloge.