

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

AGEZ Laurence

*Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de la mélatonine
sur les noyaux suprachiasmatiques, rôle de trois récepteurs orphelins.*

Soutenue le 23 avril 2007 devant la commission d'examen :

Dr. Benoît Malpoux
Dr. François Rouyer
Pr. François Lasbennes
Pr. François Guier

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS



A mes **parents**, pour le libre choix que vous m'avez toujours accordé, pour vos encouragements tout au long de ce quart de siècle d'études et de formations, dans les périodes de doute comme d'espoir. Vous avez été un soutien tant financier que moral et je vous en serai éternellement reconnaissante. Merci !

Un grand merci également à ma marraine **Jeanine**, son mari **Guy** et mon oncle **Marcel** qui par leurs conseils avisés, leur soutien tant moral que financier ont permis la réussite de ce projet.

A mes deux meilleurs amies : **Sol et Ch'Do** qui, quand j'en avais besoin, ont toujours répondu présente quelle que soit l'heure. Elles ont été les témoins de mes plus grands coups de blues et de mes plus grands fous rires. Elles ont une place spéciale toutes les deux dans mon cœur.

A mon petit frère **Frédéric** qui, à sa façon, m'a appris à repousser mes limites. Je le remercie énormément pour cela.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma reconnaissance au **Dr. Mireille Masson-Pévet** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, ainsi que le **Dr. Paul Pévet** pour ses précieux conseils lors de nos conversations scientifiques.

Je tiens à remercier le **Pr. François Gauer** pour son encadrement, sa vision scientifique, sa pédagogie et les conseils avisés qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail de thèse. Je tiens également à le remercier pour la confiance qu'il m'a manifestée et qui m'a permis de développer mes capacités d'autonomie dans le travail.

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

Je voudrais également exprimer ma gratitude au **Dr. Virginie Gydé-Laurent** qui n'a pas compté son temps pour répondre à mes questions et me conseiller en biologie moléculaire. Ses grandes qualités d'écoute et son dynamisme ont été particulièrement importants. Sans son aide et son amitié, les choses auraient sûrement été bien différentes.

Je remercie le **Dr. André Malan** pour m'avoir aidée dans les méandres des statistiques, du traitement de données, de la modélisation de courbes par régression non linéaire et pour sa patience à m'enseigner l'utilisation du logiciel Sigma plot.

Je tiens à remercier de même le **Dr. Françoise Eclancher**, qui a eu le courage de reprendre la syntaxe de l'ensemble de ce manuscrit, sa tâche fut immense...

Je remercie tous les *jeunes* de ce laboratoire : tout d'abord, **Céline Feillet** *alias* Docus dont la voix est inimitable! Depuis le début, à savoir mon arrivée en DEA, nous avons partagé les bons comme les moins bons moments, dans et hors du labo. Ma voisine de palier, le point de ralliement pour la majorité de nos soirées en grand ou petit comité. Elle sera, j'en suis sûre, un professeur sans pareil et inoubliable pour ses étudiants ; le Dr. **Benjamin Tournier**, pour son sens de l'humour et son amitié, pierre angulaire des *afters*, il fut certainement à l'origine du bon esprit de groupe qui régna parmi les *jeunes* de ce laboratoire ; le **Dr. Laurent Tritschler et Anne Seeberger**, tous deux des amis sincères, je leur dit merci et bonne chance pour la suite qui s'annonce déjà belle ; le Dr. **Caroline Graff**, notre GO des congrès, **Anthony**

Salingre notre shreck national et **Emeline Umbrecht-Jenk** pour nos diverses soirées passées ensemble. Un grand merci également à **Mathieu Chansard**, **Zeina Malek**, **Dr Florent Revel**, **Dr. Jorge Mendoza** et **Dr Sandrine Siffroi-Fernandez** pour leurs conseils et leur amitié, je leur souhaite une réussite brillante. Enfin, à ceux qui ont entrepris cette formation si particulière : **Aurélie Béglé**, **Corina Bobu** et tous les autres, je leur souhaite beaucoup de courage et de réussite.

Merci au membres de « l'équipe du matin » : **Dominique**, **Fafa**, **Sylviane**... pour nos conversations souvent animés sur des sujets aussi divers que variés, pour leur aide ainsi que pour leur gentillesse. Merci également à **Daniel Bonn** et **Aurore Senser** d'avoir pris grands soins de tant de rongeurs et de m'avoir aidée au cours d'expériences quelquefois très longues!

Merci enfin à tous les membres du Département de Neurobiologie des Rythmes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail pour leur disponibilité.

Parce qu'il y a une vie en dehors du laboratoire : **Elodie**, notre super majorette de DEA et mon sponsor de début de thèse, la parisienne **Emmanuelle** pour nos longues discussions autour d'une pinte, notre **Magali** nationale rayon de soleil du sud. Mais également Céline Legros *alias* **Miss mout-mout** et Eric Trecherelle *alias* **Becquerel** pour nos conversations scientifiques très intéressantes mais également le gentillesse et leur sens de l'humour à tout épreuve. Sans le savoir, vous m'avez toutes beaucoup aidé dans ce travail, car vous m'avez permis de rire et m'avez soutenue en cas de coup dur. J'espère que longtemps encore nous pourrons rire ensemble, autour d'une pinte, d'un orangina ou d'un chocolat chaud, quoi qu'il arrive dans la vie de chacun d'entre nous.

SOMMAIRE



REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE.....	6
ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION.....	12
I. Les rythmes circadiens : généralités.....	13
II. Les noyaux suprachiasmatiques : l'horloge circadienne principale des mammifères.....	17
A. Démonstration expérimentale : lésions et greffes (mutant <i>tau</i>)	17
B. Organisation cellulaire des NSC	17
1. Localisation et anatomie.....	17
2. Le GABA	20
3. L'arginine vasopressine (AVP).....	20
4. Le vasoactive intestinal peptide (VIP)	21
5. Le gastrin-releasing peptide (GRP).....	22
6. La somatostatine (SOM)	22
C. Synchronisation de l'horloge avec l'environnement.....	23
1. Le tractus rétino-hypothalamique et la synchronisation photique	23
2. Synchronisation non photique.....	26
3. La distribution du message circadien	28
III. Les bases moléculaires de la rythmicité circadienne dans les NSC	29
A. Les « gènes horloges »	29
1. La boucle de rétrocontrôle positive	29
2. La boucle de rétrocontrôle négative	32
3. Les gènes de sortie de l'horloge	35
4. Les autres partenaires potentiels des gènes horloges	36
B. Les « récepteurs orphelins »	37
1. Généralités.....	37
2. La fixation à la séquence RORE	38
3. Les gènes <i>rev-erb</i>	39
a. Fonction circadienne	39
b. Fonction non circadienne	43
4. Les gènes <i>ror</i>	47
a. Le gène <i>rorα</i>	47
b. Le gène <i>rorβ</i>	50
c. Le gène <i>rorγ</i>	51
C. Les PPAR, le lien métabolique des gènes horloges	52
D. Les modifications post-transcriptionnelles.....	54
a. Les caséines kinases	55
b. Les MAP kinases.....	56
c. Les autres protéines kinases	57

IV. La mélatonine	58
A. Introduction	58
B. La synthèse de la mélatonine et son métabolisme.....	58
1. Synthèse	59
2. La régulation nerveuse de la synthèse de la mélatonine	61
3. La régulation moléculaire de la synthèse	63
4. Le métabolisme	64
C. Les récepteurs de la mélatonine	64
1. Introduction et généralités	64
2. Les récepteurs de la mélatonine	65
a. Les récepteurs de haute affinité.....	65
b. Les sites MT ₃ : la quinone réductase 2.....	73
c. Le GPR 50	73
D. Les effets de la mélatonine.....	74
1. Le rôle saisonnier de la mélatonine.....	74
2. La <i>pars tuberalis</i>	76
a. Anatomie et localisation.....	76
b. La mélatonine et la sécrétion de prolactine.....	78
c. La PT : mélatonine et gènes horloges	79
3. Les effets de la mélatonine sur le système circadien	81
a. L'entraînement de l'horloge par la mélatonine	81
b. Les injections de mélatonine <i>in vivo</i>	82
c. Une approche <i>in vitro</i>	83
V. Conclusions et objectifs de mon travail.....	85
MATERIELS ET METHODES	87
I. Les animaux	88
II. La Chirurgie	88
III. L'apport en mélatonine	89
IV. Le sacrifice des animaux.....	89
V. L'hybridation <i>in situ</i>	90
A. Principe.....	90
B. Clonage des gènes utilisés.....	92
C. Les plasmides	94
D. Synthèse des sondes	95
1. Synthèse	95
2. Purification	96
E. Protocole d'hybridation <i>in situ</i>	96
1. Etapes de pré-hybridation.....	96
2. Hybridation.....	97
3. Etapes de post-hybridation	97
VI. Autoradiogramme : réalisation et quantification.....	98
A. Principe.....	98
B. Protocole.....	98

C.	Quantification.....	98
D.	Analyses statistiques	98
1.	Analyse de variance (ANOVA)	99
2.	Régressions non linéaires	99
VII.	Dosage radioimmunologique.....	100
A.	Principe.....	100
B.	Protocole.....	100
1.	Extraction de la mélatonine.....	100
2.	Dosage de la mélatonine	100
	RESULTATS	102
I.	Les effets d'une injection de mélatonine dans les NSC.....	104
A.	Abstract	104
B.	Introduction:.....	104
C.	Experimental procedures.....	105
1.	Animals	105
2.	Melatonin levels	106
3.	<i>In situ</i> hybridization	106
4.	Statistical analysis	106
D.	Results	106
E.	Discussion	108
F.	Conclusion.....	111
G.	Acknowledgements	111
H.	References	111
II.	Les effets de la pinealectomie dans les NSC et la PT	115
A.	Abstract	115
B.	Introduction	115
C.	Experimental procedures.....	117
1.	Animals	117
2.	Pinealectomy	118
3.	Melatonin	118
4.	<i>In situ</i> hybridization	119
5.	Statistical analysis	120
D.	Results	121
1.	Effect of pinealectomy in the SCN	121
2.	Effect of pinealectomy in the PT.....	122
E.	Discussion	122
F.	Acknowledgements	126
G.	References	127
H.	Figures.....	132
1.	Melatonin blood level.....	132
2.	<i>Rev-erba</i> α <i>ror</i> β and <i>per1</i> mRNA expression in the rat SCN.....	133
3.	NOR mRNA expression in the SCN, 3 months after pinealectomy	134
4.	Clock genes mRNA expression in the rat SCN, 3 months after pinealectomy ..	135
5.	<i>Rev-erba</i> α , <i>ror</i> β and <i>per1</i> mRNA expression in the rat PT.....	136
	DISCUSSION	138

I.	Les effets de la mélatonine sur les NSC	139
A.	Effet de l'injection pharmacologique	139
B.	Concentration de mélatonine dans les NSC	144
C.	Effet de la pinéalectomie	148
II.	Les effets de la mélatonine sur la PT	149
A.	Effet de l'injection pharmacologique	149
B.	Effet de la pinéalectomie	152
	PERSPECTIVES	157
III.	La voie d'action de la mélatonine dans la PT	158
IV.	Le schéma temporel d'action de la mélatonine dans les NSC	159
A.	Étude <i>in vivo</i> : les conséquences d'une invalidation génique	160
B.	Étude <i>in vitro</i> : les SCN 2.2.....	161
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163
	CURRICULUM VITAE.....	193

ABREVIATIONS

2DG : 2-déoxyglucose	LCR : liquide céphalo-rachidien
4P-PDOT : le 4-phénylpropionimidotétraline	LD : light-dark
5HTP : 5-hydroxy-tryptophane	LL : lumière constante
5HT : sérotonine	LP : photopériode longue
5' RACE	MAPK : mitogen-activated protein kinase
AA : acide arachidonique	MCA-NAT : 5-methoxy-carbonylamino-N-acétyl-tryptamine
AA-NAT : arylalkylamine-N-acétyltransférase	MPOA : aire préoptique médiane
AC : adénylate cyclase	NA : noradrénaline
AF: fonction activatrice	NAS : N-acétylsérotonine
AMPc : adénosine 3'5'-cyclique monophosphate	NECA : 5' N éthyl carboxamid adénosine
APO : apolipoprotéine	NMDA: N-methyl-D-aspartate
ATP: adénosine triphosphate	NPY : neuropeptide Y
AVP : arginine vasopressine	NR1D1 : nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
α ODN : α Oligodéoxynucléotides	NSC : noyaux suprachiasmatiques
β -FSH : follicle Stimulating hormone	PACAP : polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire
β -LH : luteinizing hormone	PAS : P-CREB: phospho-CREB
β -TSH : thyroid stimulating hormone	PD : <i>pars distallis</i>
BHE : barrière hémato-encéphalique	PDE : phosphodiesterase
BHLH: basic helix loop helix	Per : period
Bmal1 : brain and muscle ARNT like protein 1	P _i P ₂ : phosphatidylinositol bisphosphate
Ca ²⁺ _i : Ca ²⁺ intracellulaires	PK2 : la prokinétine 2
CAM kinase IV: calcium/calmoduline kinase IV	PKA : protéine kinase A
C/B : dimère CLOCK/BMAL1	PKC : protéine kinase C
CCG : clock controlled genes	PKG : protéine kinase G
C/EBP : CCAAT enhancer binding protein	PLC : phospholipase C
CKI : caséine kinase I	PP5 : protéines phosphatases 5
Clock: clock circadian locomotor output cycle kaput	PPAR : peroxisomes proliferator activated receptors
CRE : cAMP-response-element	PPRE : PPAR response element
CRY : cryptochromes	PRC : courbe de réponse de phase
CT12 : temps circadien 12	PRL : prolactine
DD : Dark-Dark	PT : <i>pars tuberalis</i>
DAG : diacylglycérol	PTX : toxine pertussique
DBP : albumin gene D-site binding protein	PVN : noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus
DEC : différencié embryo chondrocyte	PVT : noyaux paraventriculaires du thalamus
DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus	QR : quinone réductase
GABA : acide γ -amino-butirique	RHT : tractus rétino-hypothalamique
GAD : décarboxylase de l'acide glutamique	RIA : radio-immuno assay
GC : guanylate cyclase	ROR : retinoic acid related orphan receptors
GHT : tractus géniculohypothalamique	RORE : ROR response element
GLU : glutamate	RPA: RNase protection assay
GMPc : guanosine 3'5'-cyclique monophosphate	RXR : retinoic X receptor
GnRH : gonadotropin Releasing Hormone	SCG : ganglions cervicaux supérieurs
GRP: gastrin releasing peptide	SNC : système nerveux central
GSH : glycogène synthétase kinase	SOM : somatostatine
GTP : guanosine triphosphate	SON : noyaux supra-optiques
HAT : histone acétyl transférase	SP : photopériode courte
HDAC3 : histone désacétylase 3	SPVN : noyaux subparaventriculaires
HDL : high density lipoprotein	SPZ : zone subparaventriculaire
HIOMT : hydroxyindole-O-méthyle transférase	TGF- α : transforming growth factor α
HIS : hybridation <i>in situ</i>	Trp : tryptophane
Icer : inductible cAMP early repressor	VIP : peptide vasoactif de l'intestin
ICV : intra cérébro-ventriculaire	vLDL : lipoprotéine faiblement dense
IGL : feuillet inter géniculés	ZT0 : Zeitgeber Time 0
IML : colonne intermédiolatérale	
IP ₃ : inositol tri-phosphate	
K _D : constante de dissociation	

INTRODUCTION



I. Les rythmes circadiens : généralités

La Terre tourne sur elle-même en 24 heures, imprimant ainsi une alternance régulière du jour et de la nuit, et autour du soleil ce qui est à l'origine des cycles saisonniers. Au cours de ces cycles, les caractéristiques du milieu varient considérablement, qu'il s'agisse de la luminosité, de la température, de l'hygrométrie ou encore de la disponibilité en ressources alimentaires. C'est à ces variations temporelles de l'environnement que les espèces ont donc dû s'adapter pour leur survie. D'un point de vue saisonnier, de nombreux Mammifères répondent à ces variations par des modifications adaptatives de certaines de leurs fonctions physiologiques et comportementales. Il est connu que la naissance des petits coïncide avec le printemps, période pendant laquelle une disponibilité alimentaire suffisante et de bonnes conditions climatiques sont propices à leur survie. A l'échelle du temps journalier, la période d'activité de nombreuses espèces telles que la souris ou le rat est un autre exemple d'adaptation comportementale. Leur activité est limitée à la période obscure du nycthémère, rendant leur détection visuelle et donc leur capture plus délicate par les prédateurs pendant cette période du cycle jour-nuit.

Pour synchroniser les fonctions physiologiques et comportementales avec les variations nycthémérales et saisonnières de l'environnement, des mécanismes permettant d'anticiper ces variations ont été sélectionnés au cours de l'évolution. Cette adaptation s'est faite notamment grâce à la mise en place d'une horloge capable de se synchroniser et de distribuer à tout l'organisme un message temporel permettant l'anticipation des changements du milieu. 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 de 24 heures dans des conditions constantes, mettant ainsi en évidence l'existence d'une horloge capable de fonctionner de façon autonome (cités dans Canguilhem et Boissin, 1998).

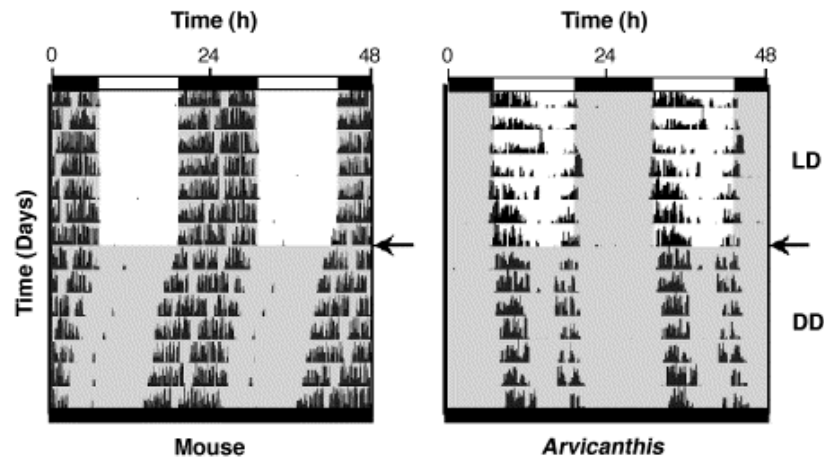


Figure 1: Enregistrement représentatif de l'activité locomotrice de roue en double représentation chez la souris *Mus musculus* (rongeur nocturne) et *Arvicanthis ansorgei* (rongeur diurne). Les animaux sont placés en condition d'alternance jour/nuit (LD12:12, barre horizontale blanche représentant le jour, et barre horizontale noire représentant la nuit en haut), avant d'être maintenus en obscurité constante (barre horizontale noire en bas) au moment indiqué par la flèche. Les zones grisées représentent l'obscurité. La souris (comme le rat) présente un rythme nocturne d'activité locomotrice nettement marqué. A l'inverse, l'activité locomotrice de l'*Arvicanthis ansorgei* est tout aussi rythmique mais s'effectue pendant le jour. En libre cours, la souris montre une rythmicité endogène inférieure à 24 heures et l'*Arvicanthis ansorgei* légèrement supérieure à 24 h.

Un autre exemple de l'existence de rythme circadien chez les Mammifères ainsi que de leur autonomie est illustré par le rythme d'activité locomotrice. L'activité locomotrice (cf. figure 1) d'un rongeur nocturne (tel que la souris ou le rat), placé dans une cage individuelle avec un accès à une roue, est enregistrée en comptant le nombre de tours de roue effectués par période de dix ou quinze minutes. Le rythme d'activité locomotrice persiste en libre cours comme, par exemple, en condition de nuit constante (DD, Dark-Dark) et il est donc endogène avec une période appelée *Tau*, proche de 24 heures.

Le terme circadien (*circa* : autour et *diest* : jour) est utilisé pour décrire un phénomène qui se répète de façon cyclique, avec une période *Tau* proche de 24 h (comprise entre 20 et 28 h). Les 24 heures sont divisées en un jour subjectif qui correspond à la période du rythme circadien où l'animal se comporte comme s'il faisait jour (phase de repos pour un animal nocturne, phase d'activité pour les espèces diurnes) et en une nuit subjective correspondant à la période du rythme circadien où l'animal se comporte comme s'il faisait nuit. Pour des raisons pratiques, la période endogène *Tau* est alors divisée en 24 heures circadiennes et chaque heure circadienne a une durée d'un vingt-quatrième de *Tau*. Par convention, CT 12 (temps circadien 12) correspond au début de la nuit subjective. Si les animaux sont placés en conditions d'alternance jour/nuit LD (Light-Dark 12:12, 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité), la période du rythme d'activité est égale à exactement 24 heures, l'horloge endogène est donc capable de se synchroniser avec le monde extérieur pour être totalement en phase avec celui-ci. Le synchroniseur lumineux est le plus puissant des donneurs de temps ou Zeitgeber (*Zeit* : temps et *Geber* : donneur) et par convention, l'arrivée du jour définit le ZT 0 (Zeitgeber Time 0). Les rythmes ayant une période inférieure à 20 h (allant jusqu'à la milliseconde), sont qualifiés d'ultradiens et les rythmes ayant une période supérieure à 28 h sont infradiens. Seuls les rythmes circadiens seront abordés ici.

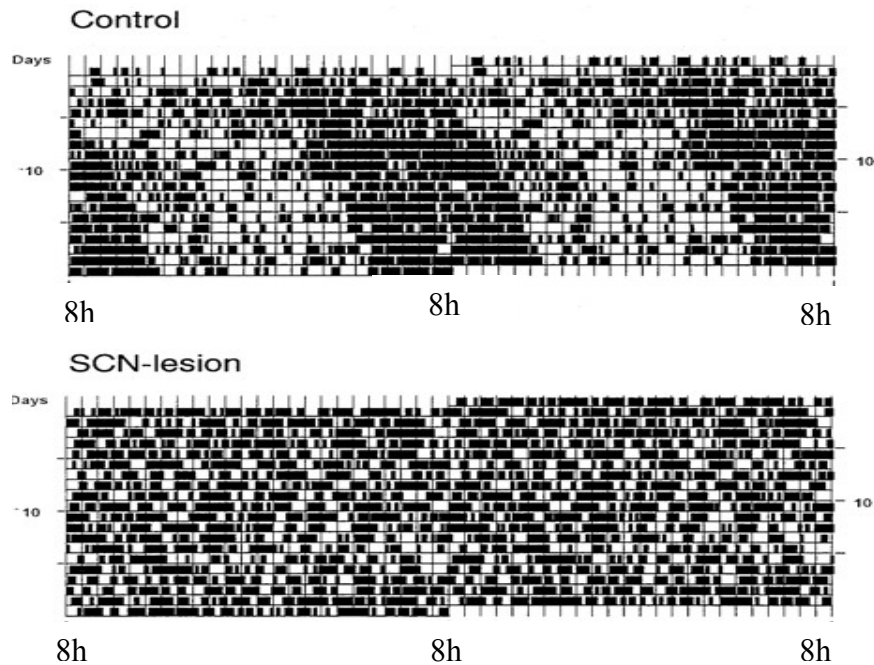


Figure 2 : Les NSC, siège de l'horloge biologique principale des Mammifères.

Actogrammes d'un rat placé en obscurité constante. L'activité locomotrice est représentée par des batons noirs. Les actogrammes sont en double représentation, c'est à dire que le jour 2 est représenté à la fois sur la première ligne et la seconde ligne. La lésion des NSC entraîne une arythmie de l'activité locomotrice confirmée par l'actogramme.

Moore et Eichler, 1972; Stephan et Zucker, 1972

II. Les noyaux suprachiasmatiques : l'horloge circadienne principale des mammifères

A. Démonstration expérimentale : lésions et greffes (mutant *tau*)

Bien que l'existence de rythmes circadiens endogènes soit acquise depuis longtemps, la localisation tissulaire de l'horloge biologique circadienne et les mécanismes impliqués dans la genèse de cette rythmicité sont assez récents. En 1972, Stephan, Zucker et Moore montrèrent que les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC) sont nécessaires à l'expression des rythmes d'activité locomotrice et de prise hydrique. En effet, une destruction de cette structure paire provoquait la perte du rythme circadien de ces activités comportementales (cf. figure 2). Ces mêmes auteurs ont ensuite montré que ces rythmes étaient restaurés après transplantation de NSC, confirmant le rôle majeur de cette structure dans le contrôle des rythmes circadiens (Stephan et Zucker, 1972 ; Moore et Eichler, 1972). Cependant, ces expériences n'ont pas pu apporter la preuve formelle que les NSC étaient le siège d'un oscillateur endogène, mais tout au plus un relais obligé dans le contrôle de ces activités rythmiques.

En 1988, une souche de Hamster doré nommée mutant *tau* dont la forme homozygote présente une période d'activité locomotrice proche de 20 heures fut isolée (Ralph et Menaker, 1988). En 1990, Ralph et ses collaborateurs démontrèrent que chez des Hamsters sauvages dont les NSC ont été lésés, la transplantation de greffon de NSC prélevés chez des mutants *tau*, restaure une rythmicité circadienne avec la période phénotypique de la souche *tau* (Ralph et al., 1990). Ces résultats montrent ainsi par des greffes croisées que ce sont les NSC du donneur qui imposent la période au reste du cerveau et que les NSC sont réellement le siège de l'horloge (Boer et al., 1999 ; Ralph et al., 1990 ; Sollars et al., 1995).

B. Organisation cellulaire des NSC

1. Localisation et anatomie

Les NSC sont une structure paire à l'aplomb du chiasma optique. Chez le rat, ils contiennent environ 10 500 neurones chacun, organisés en un réseau très dense de petits neurones (cf. figure 3) et mesurent 400 µm de haut, 425 µm de large et 900 µm de longueur

rostro-caudale (Van den Pol, 1980). Les NSC peuvent être divisés morphologiquement en une petite zone rostrale et une large zone caudale subdivisée en deux parties : la partie dorso-médiale appelée dmNSC ou « shell » et la partie ventrale appelée vlNSC ou « core » (Leak et al., 1999). La partie dmNSC est caractérisée par de petits neurones allongés avec un grand noyau qui sont étroitement organisés et reliés entre eux au niveau de leurs corps cellulaires. La partie vlNSC est caractérisée par des neurones sphériques peu denses dont les corps cellulaires sont séparés par des cellules gliales qui entourent complètement les jonctions synaptiques. Ces neurones communiquent entre eux par des jonctions GAP (Guldner et Wolff, 1996 ; Van den Pol, 1980 ; Welsh et Reppert, 1996). Ces deux parties se distinguent également par des marquages immunoréactifs différents pour les neuropeptides dont l'arginine vasopressine (AVP) ou le peptide vasoactive intestinal (VIP) que nous aborderons plus tard (cf. § II.B.3 et II.B.4).

Cependant, la grande majorité des neurones exprime un neurotransmetteur commun : l'acide γ -amino-butirique (GABA) qui est ainsi co-localisé avec l'ensemble des neuropeptides présents dans les NSC (Moore et Speh, 1993). Chez le rat, la plupart des neurones du dmNSC synthétisent l'AVP alors que les neurones du vlNSC synthétisent le VIP, le peptide histidine-isoleucine et/ou le gastrin releasing peptide (GRP) (Swaab et al., 1975 ; Van den Pol et Tsujimoto, 1985 ; Vandesande et al., 1975 ; Card et al., 1981 et 1988 ; Mikkelsen et al., 1991 ; Sims et al., 1980). Une petite proportion de neurones produisant la somatostatine (SOM) est trouvée dans ces deux populations (Card et al., 1981). Par ailleurs, la présence de quelques neurones glutamatergiques a été montrée dans les NSC (Hermes et al., 1996, Csaki et al., 2000 ; Cui et al., 2000 ; Perreau-Lenz et al., 2004). Ces neurones projettent essentiellement sur les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN) (Csaki et al., 2000).

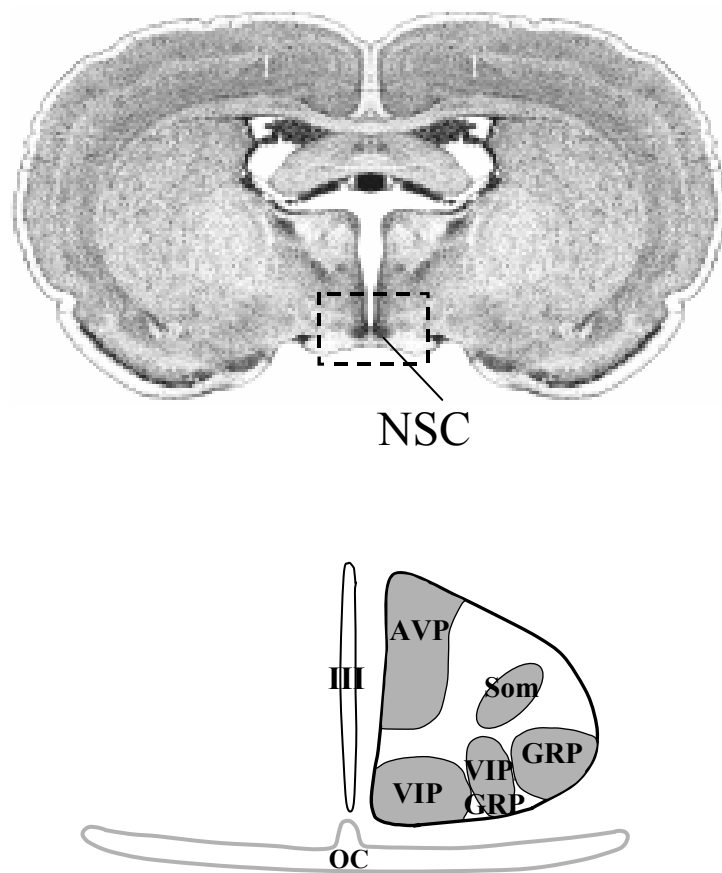


Figure 3 : *Anatomie des NSC et localisation histologique des principaux neuropeptides chez le rat.*

AVP : arginine vasopressine; GRP : gastrin releasing peptide ; OC : chiasma optique ; Som : somatostatine ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; III : troisième ventricule (adapté de Romijn et al., 1997 et de Swanson, *Brain maps*).

D'autres substances ont été détectées par immunocytochimie dont l'angiotensine 2 (Block et al., 1988 ; Kilcoyne et al., 1980 ; Lind et al., 1985), la dynorphine (Zamir et al., 1983), la substance P (Mikkelsen et Larsen, 1993), la calbindin-D_{28K} (Silver et al., 1996) et nombre d'entre elles présentent des co-localisations avec le VIP et avec l'AVP (enképhaline et AVP : Sakanaka et al., 1990 ; dynorphine et AVP : Watson et al., 1982 ; VIP et corticotrophin releasing hormone : Daikoku et al., 1985). Cette régionalisation des NSC, morphologique mais aussi fonctionnelle, comme le suggère la cartographie de l'expression des différents neuropeptides, a été utilisée par de nombreux auteurs pour attribuer à ces 2 parties des NSC, des rôles différents dans la génération et la régulation des rythmes circadiens (van Esseveldt et al., 2000). Enfin, cette régionalisation est également retrouvée au niveau de la localisation des récepteurs de la mélatonine (§ IV.D.2) qui seraient préférentiellement exprimés dans les zones vasopressinergiques de la partie dorso-médiale des NSC (Maywood et al., 1995).

2. Le GABA

La présence en abondance du GABA et de ses récepteurs suggère leur rôle important dans les NSC. L'ARNm de l'enzyme de synthèse du GABA, la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD) qui transforme l'acide glutamique en GABA, présente un rythme journalier avec un maximum pendant le jour (Huhman et al., 1996). De plus, le GABA et le niveau d'activité de la GAD présentent un rythme journalier en LD et en DD dans des tranches de NSC (Aguilar-Roblero et al., 1992). Le GABA exerce une activité inhibitrice tonique durant le jour subjectif qui est abolie par l'administration d'un antagoniste du GABA sur des NSC en culture (Kim et Dudek, 1992 ; Mason et al., 1991). Il inhibe la synthèse de la mélatonine, véhicule du message hormonal circadien (cf. § IV) en agissant négativement sur les PVN quelle que soit l'heure du nyctémère (Kalsbeek et al., 1999 ; Cui et al., 2000). En résumé, les NSC transmettent l'information journalière vraisemblablement *via* des fibres GABAergiques aux PVN, premier relais de cette voie polyneuronale (Kalsbeek et al., 1999).

3. L'arginine vasopressine (AVP)

La partie dmNSC est caractérisée par une immunoréactivité pour l'AVP. Les niveaux d'expression de l'ARNm et du neuropeptide présentent une oscillation circadienne dans les NSC avec un maximum durant le jour subjectif (Tominaga et al., 1992 ; Yamase et al., 1991 ; Cagampang et al., 1994). Une lésion des NSC abolit les variations rythmiques de l'AVP dans

le liquide céphalorachidien et le plus souvent ce peptide devient indétectable (Schwartz et Reppert, 1985). Son récepteur V1a situé à la fois sur les neurones vasopressinergiques et les neurones à VIP, présente également une oscillation nycthémérale en LD, en opposition de phase avec le rythme de l'AVP (Young et al., 1993). Bien que ce neuropeptide ait été le plus étudié dans les NSC, son rôle n'est pas encore totalement clarifié mais il semble être fortement impliqué dans les rythmes veille-sommeil (Kruisbrink et al., 1987 ; van Esseveldt et al., 2000). En effet, l'administration intra-cérébro-ventriculaire (ICV) d'agoniste d'AVP provoque une augmentation de l'amplitude du rythme veille-sommeil, alors qu'une infusion d'antagoniste d'AVP provoque une augmentation de la quantité de REM sans toucher à l'amplitude du rythme veille-sommeil (Kruisbrink et al., 1987). L'AVP pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de l'activité locomotrice. En effet, le rat *brattleboro* (ne synthétisant pas d'AVP) présente un niveau d'activité locomotrice moindre que celui du rat sauvage (Ingram et al., 1998). Cependant, la corrélation que l'on pourrait déduire doit être modérée car aucune corrélation entre les différences journalières d'activité locomotrice et les différences d'intensité de l'expression de l'AVP n'a pu être montrée chez ces deux animaux (Hochstetler et al., 2004). Par ailleurs, chez ce rat *brattleboro* la diminution de l'amplitude du rythme d'activité électrique de NSC sur tranche, étaye, tout au plus, l'hypothèse d'un rôle de la vasopressine dans la modulation par amplification de l'activité électrique des NSC (Ingram et al., 1996 ; Groblewski et al., 1981).

4. Le vasoactive intestinal peptide (VIP)

Comme l'AVP, le VIP présente un rythme nycthéméral de transcription et de traduction, mais des différences majeures existent entre leurs rythmes. Les niveaux d'ARNm du VIP et de sa protéine présentent un rythme nycthéméral dans le vlNSC en LD, avec un maximum d'expression durant la nuit, mais qui est aboli en condition d'obscurité constante (Albers et al., 1990 ; Larsen et al., 1994 ; Shinohara et al., 1993 ; Isobe et Nishino, 1996). Les neurones à VIP sont innervés par les fibres rétiniennes (dont les synapses libèrent le polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire (PACAP)) (Ibata et al., 1989 ; Okamoto et al., 1991). Les récepteurs du VIP de type II comprennent les récepteurs VPAC₁ absents des NSC et VPAC₂ exprimés dans les NSC qui se lient au PACAP et au VIP avec des affinités semblables (Hannibal, 2002). L'expression rythmique de VPAC₂ est observable à la fois en LD et en DD, avec une expression maximale biphasique peu marquée à ZT 10 et ZT 22 (Cagampang et al., 1994). Le récepteur VPAC₂ semble jouer un rôle majeur à la fois dans

l'entraînement photique et dans le maintien des rythmes, ce qui suggère que le VIP et/ou le PACAP soient des éléments nécessaires au fonctionnement normal de l'horloge circadienne (Shen et al., 2000 ; Harmar et al., 2002). En effet, une mutation du gène *vrp2* (codant pour le récepteur VPAC₂) chez les souris induit une arythmie de l'activité locomotrice en LD et en DD (Harmar et al., 2002 ; Cutler et al., 2003 ; Aton et al., 2005). De plus, une application de VIP sur des tranches de NSC en culture entraîne un déphasage de l'activité électrique dépendant du récepteur VPAC₂ suggérant que ce neuropeptide peut modifier la phase ou la période de l'horloge (Reed et al., 2001).

5. Le gastrin-releasing peptide (GRP)

Le GRP se trouve exprimé exclusivement dans le vlNSC, et peut être co-localisé avec le VIP (Mikkelsen et al., 1991 ; Romijn et al., 1998). Tout comme le VIP, les cellules à GRP reçoivent une innervation rétinienne (Earnest et al., 1993 ; Tanaka et al., 1997). Ce neuropeptide présente un rythme nycthéméral d'expression d'ARNm et de sa protéine. Chez le rat, le pic diurne de la protéine, aboli en DD, est en opposition de phase avec celui du VIP (Okamura et Ibata 1994). Cependant lorsque l'animal est placé en lumière constante, l'expression du GRP se trouve augmentée (alors que celle du VIP est réduite) (Shinohara et al., 1993) mais des résultats contradictoires existent (Isobe et Nishino, 1996). Tout comme le VIP, le GRP peut induire des décalages de phase de l'activité électrique des NSC de façon dose dépendante et phase-dépendante, avec un retard de phase lors d'une application en début de nuit et une avance de phase induite par une application en fin de nuit (Shibata et al., 1994 ; Piggins et al., 1995 ; McArthur et al., 2000). Quant aux décalages de phase de l'activité locomotrice, les effets d'une co-administration de VIP/GRP comparés à l'application d'un seul de ces deux neuropeptides demeurent contradictoires (Albers et al. 1991 ; Piggins et al., 1995).

6. La somatostatine (SOM)

La SOM, comme l'AVP, présente un rythme d'expression journalier qui persiste en DD, avec un pic diurne chez le rat (Fukuhara et al., 1994 ; Shinohara et al., 1993 ; Yang et al., 1994 ; Nishiwaki et al., 1995 ; pour revue : Inouye et Shibata, 1994). Les neurones exprimant la SOM sont localisés dans la partie ventrale du dmNSC (Tanaka et al., 1996). Ils constituent donc une population à part, bien qu'une co-localisation avec le VIP ou l'AVP soit possible (Tanaka et al., 1996). La SOM appliquée sur des tranches de NSC peut également induire des

décalages de phase de leur activité électrique qui sont identiques à ceux provoqués par le VIP ou le GRP (Hamada et al., 1993). Cependant, le rôle de la SOM au sein des NSC est très peu étudié et demeure encore inconnu.

C. Synchronisation de l'horloge avec l'environnement

1. Le tractus rétino-hypothalamique et la synchronisation photique

Chez les Mammifères, le principal synchroniseur (ou zeitgeber) du système de mesure du temps est la lumière dont les effets sur l'horloge centrale nécessitent la présence des yeux comme le prouvent les expériences avec des animaux énucléés (Foster et al., 1991 ; Yamazaki et al., 1999). Toutefois, des animaux aveugles, n'ayant ni cônes, ni bâtonnets, présentent tout de même un entraînement de leurs rythmes locomoteurs par l'alternance jour/nuit. Cette expérience suggère l'existence d'un pigment circadien différent de celui des cônes et des bâtonnets (Foster et Hankins, 2002). La mélanopsine, originellement identifiée dans la peau de Xénope, est ensuite retrouvée dans quelques cellules ganglionnaires de la rétine de souris (Provencio et al., 1998, 2000 et 2002 ; Berson, 2003). Les axones de ces cellules ganglionnaires se projettent sur les NSC, participant aussi à la formation du tractus rétino-hypothalamique (RTH) (Gooley et al., 2001 ; Hannibal et al., 2002 ; Hattar et al., 2002). Il semble donc que la mélanopsine soit le pigment circadien permettant la synchronisation de l'horloge. Cependant, chez la souris mutante ayant une invalidation de ce gène, l'horloge est encore synchronisée par l'alternance du jour et de la nuit (Panda et al., 2002, Ruby et al., 2002). En effet, la période d'activité locomotrice de ces souris reste identique à celle des souris sauvages en conditions LD et DD. En revanche, en lumière constante (LL), cette période est plus courte et la réponse à un créneau lumineux appliqué au cours de la nuit, est plus faible (Panda et al., 2002 et 2003 ; Ruby et al., 2002). Par contre, un autre mutant murin n'ayant ni mélanopsine, ni cônes, ni bâtonnets, perd alors toute 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, seraient donc complémentaires pour la synchronisation des rythmes circadiens des Mammifères, avec l'alternance jour/nuit.

Deux neurotransmetteurs semblent impliqués dans le relais des informations lumineuses *via* le RHT : le glutamate et le PACAP (pour revue, Hannibal, 2002). Tous deux

sont exprimés dans le RHT et ils sont libérés dans les NSC en réponse à une stimulation lumineuse (Liou et al., 1986 ; Fukuhara et al., 1997). La présence de récepteurs à ces deux neurotransmetteurs a été démontrée dans les NSC (Colwell et al., 1990 ; Mintz et al., 1999 ; Hannibal et al., 2002). Le glutamate libéré provoque une augmentation de l'activité électrique des neurones des NSC certainement *via* des récepteurs N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) (Ding et al., 1994 ; Shibata et al., 1994). Des études *in vitro* montrent que l'application de 1 μ M de PACAP durant le jour subjectif peut provoquer de larges avances de phase du rythme d'activité électrique des neurones des NSC (Hannibal et al., 1997 ; Harrington et Hoque, 1997). La liaison du PACAP à des récepteurs de type VPAC₁ entraînerait à la fois une libération de Ca²⁺ des stocks intracellulaires (Ca_i²⁺) *via* l'activation de la phospholipase C (PLC) ainsi qu'une activation de la voie de l'adénosine 3'5'-cyclique monophosphate (AMPc) (Hannibal et al., 1997 ; Kopp et al., 1999).

L'existence de photorécepteurs ailleurs que dans la rétine a également été proposée. Campbell et Murphy ont montré qu'une région derrière le genou (la région poplitée) serait sensible à la lumière et que son éclaircissement modifierait la phase des rythmes circadiens de température corporelle et de concentration de la mélatonine salivaire (Campbell et Murphy, 1998). Ce résultat n'a toutefois pas été confirmé (Yamazaki et al., 1999 ; Lushington et al., 2002 ; Wright et Czeisler, 2002) et à ce jour, la rétine reste la seule structure photosensible impliquée dans la synchronisation de l'horloge chez les Mammifères avec le cycle L/D.

Ces informations en provenance du RHT vont permettre la synchronisation photique de l'horloge avec l'extérieur. Si des rongeurs mis en DD, reçoivent un créneau de lumière, il aura des effets sur l'activité locomotrice qui dépendent du CT auquel il est appliqué. En effet, le créneau lumineux peut entraîner soit des retards de phase, c'est-à-dire que le rythme de l'activité locomotrice débute plus tard que prévu, soit des avances de phase avec l'activité débutant plus tôt que prévu, soit n'avoir aucun effet (cf. figure 4).

La mesure des avances ou retards en fonction du moment d'application des créneaux lumineux permet de définir une courbe de réponse de phase (PRC) (cf. figure 4). Chez la plupart des espèces étudiées, les PRC présentent un retard de phase en fin de jour subjectif et début de nuit subjective, et une avance de phase en fin de nuit subjective et début de jour subjectif (Pittendrigh et Daan, 1974).

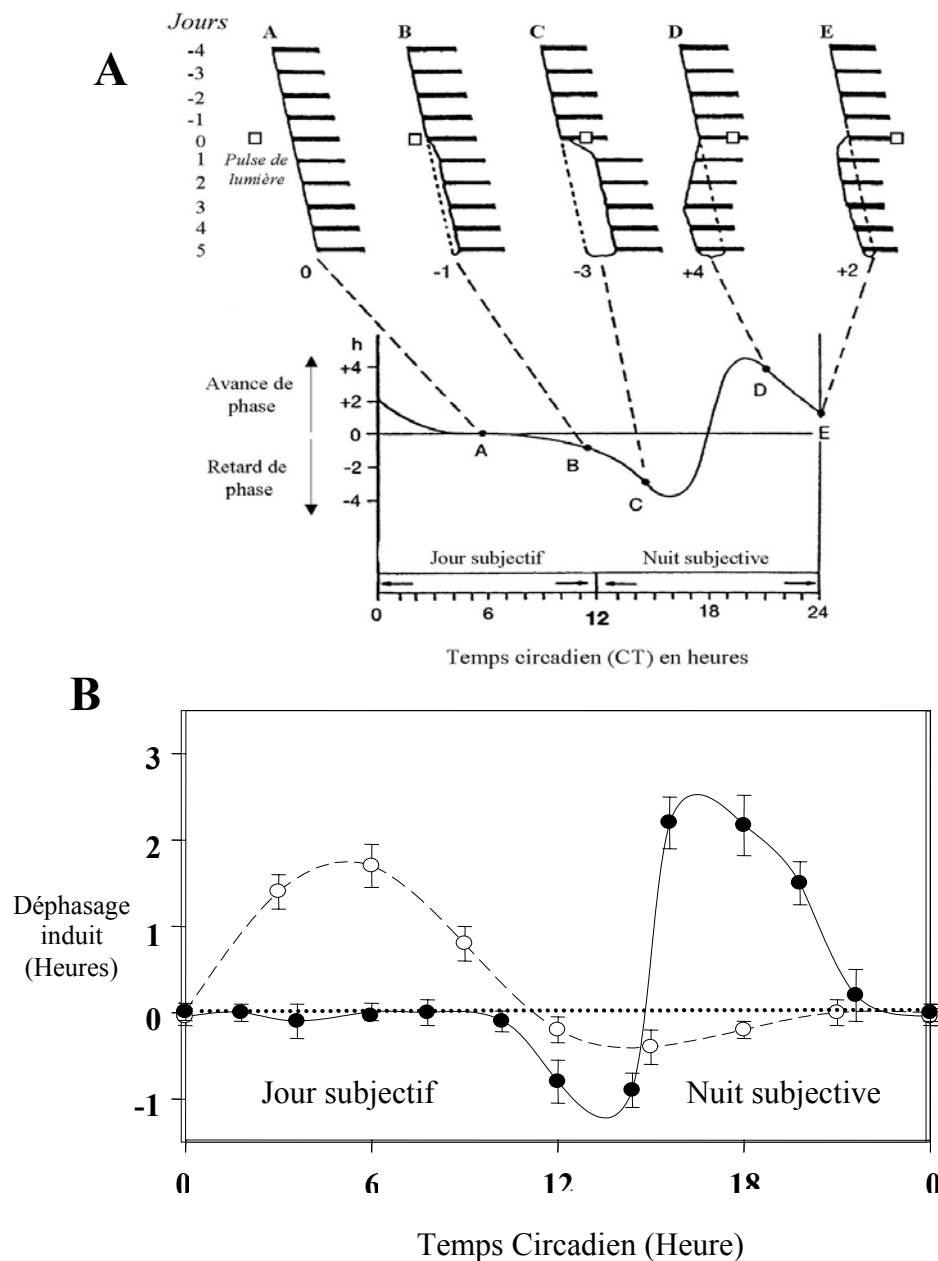


Figure 4 : Courbe de réponse de phase des effets photiques et non photiques.

(A) Effet d'un créneau lumineux (□) sur la phase du rythme d'activité en libre cours. Appliqué en fin ou en début de nuit subjective, il induit respectivement une avance ou un retard de phase du rythme. En revanche une stimulation appliquée pendant la période de repos (jour subjectif) n'a aucun effet.

(B) Courbes de réponse de phase pour des stimulations photiques (points blancs) ou non-photiques (points noirs).

(d'après Meijer et Rietveld, 1989)

Les NSC reçoivent des informations dites photiques de trois structures importantes (pour revues : Moore, 1995). Ces afférences rejoignent toutes le vNSC qui semble être le centre relayeur et intégrateur de ces informations. La voie principale de synchronisation des NSC par la lumière est le RHT, cependant le tractus géniculohypothalamique (GHT) intervient également (Meijer et Rietveld, 1989 ; Pickard, 1994), car une lésion des feuillets inter géniculés (IGL) augmente le délai de resynchronisation de l'activité des NSC par la lumière (Pickard et al., 1987 ; Edelman et Amir, 1999). Les IGL, parallèlement à leur action principale non photique, seraient donc des régulateurs de l'entraînement des NSC par les stimuli photiques véhiculés par le RHT. L'intérêt physiologique de ces multiples voies de contrôle est peut être d'assurer plusieurs contrôles permettant une synchronicité entre le temps astronomique et l'horloge endogène.

2. Synchronisation non photique

Bien qu'il soit le plus constant, 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 le rythme d'activité locomotrice des rongeurs placés en DD. 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 phase lorsqu'ils sont appliqués durant le jour subjectif (cf. figure 4). Cette similitude tient peut-être au fait qu'ils jouent sur les mêmes structures, *via* les mêmes voies de transduction ou s'opposent à un même mécanisme. Le facteur non-photique le plus étudié est de loin l'activation comportementale. Chez les hamsters dorés, la mise à disposition d'une nouvelle roue durant le jour subjectif, va inciter l'animal à courir. Cette activation engendre des avances de phase pendant le jour subjectif et de faibles retards pendant la nuit subjective (Reebs et Mrosovsky, 1989 ; Bobrzynska et Mrosovsky, 1998). L'activation comportementale a également un effet sur les gènes horloges (cf. § III.A). Pour l'homme, les facteurs sociaux peuvent dans certaines conditions, agir comme des synchroniseurs (Aschoff et al., 1971). Des injections de benzodiazépines, telles que le triazolam (Cutrera et al., 1994) ou de la morphine (Marchant et Mistlberger, 1995) sont également capables d'induire des avances de phase si elles sont appliquées durant le jour subjectif. La mélatonine (cf. § IV) et la restriction alimentaire sont, elles aussi, des facteurs non-photiques capables de modifier la phase de l'horloge circadienne et de l'entraîner (Challet et al., 1997a).

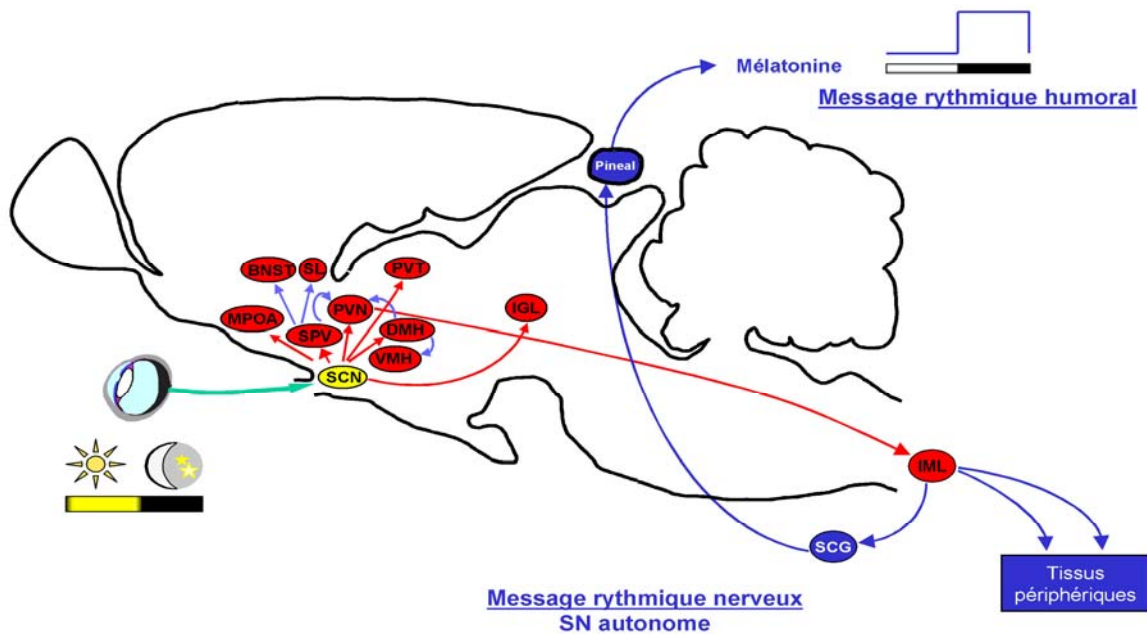


Figure 5: Efférences des NSC.

Structures innervées par les NSC. *BNST*: noyau du lit de la strie terminale; *DMH*: noyau dorsomédian; *IGL*: feuillet intergénéculé latéral; *IML*: colonne intermédiolatérale de la moelle épinière; *MPOA*: aire préoptique médiane; *PVN*: noyau paraventriculaire hypothalamique; *PVT*: noyau paraventriculaire thalamique; *SL*: septum latéral; *SCN*: noyau suprachiasmatique; *SCG*: ganglion cervical supérieur. *SPV*: zone subparaventriculaire; *VMH*: noyau ventromédia.

(d'après Buijs, 1996)

Ces effets des facteurs non photiques, autres que la mélatonine, sur l'horloge sont abolis si les voies sérotoninergiques innervant les NSC en provenance du raphé, sont détruites (Cutrera et al., 1994 ; Miller et al., 1996 ; Challet et al., 1997b). De même, une lésion des IGL affecte les changements de phase de l'activité circadienne des NSC induits par différents stimuli non photiques (Challet et al., 1996 ; Miller et al., 1996 ; Schuhler et al., 1999). En résumé, les IGL et les noyaux du raphé sont les structures directement impliquées dans la synchronisation par des facteurs non photiques des NSC (Hastings et al., 1998 ; Challet et al., 1997b ; Mintz et al., 1997 ; Schuhler et al., 1999).

3. La distribution du message circadien

Une grande majorité des fibres efférentes des NSC projettent dans la région médiane de l'hypothalamus atteignant l'aire préoptique médiane (MPOA), les PVN, les noyaux subparaventriculaires (sPVN) et le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH). Les cibles extra-hypothalamiques des NSC sont les noyaux paraventriculaires du thalamus (PVT) et les IGL (pour revue Leak et Moore, 2001 ; Kalsbeek et al., 2002) (cf. figure 5).

Des preuves expérimentales étayent l'hypothèse de l'existence d'une communication par facteurs diffusibles en plus de cette communication nerveuse des NSC. En effet, Silver et ses collaborateurs ont observé que le rythme d'activité locomotrice est restauré après une greffe de NSC encapsulés (excluant toute création de synapses), chez des animaux dont les NSC étaient lésés (Silver et al., 1996b). De même, une lésion des différents noyaux cibles des NSC, cités ci-dessus, n'abolit jamais complètement le rythme d'activité locomotrice. Ces études démontrent que les NSC peuvent contrôler au moins certains rythmes par libération directe de facteurs. Deux facteurs diffusibles sont candidats pour contrôler l'activité locomotrice : le transforming growth factor α (TGF- α) et la prokinéticine 2 (PK2). Leur sites d'action pourraient être pour le TGF- α , la zone subparaventriculaire (SPZ) qui se situe caudalement aux NSC, et dont l'implication dans le contrôle de l'activité locomotrice a été démontrée (Lu et al., 2001) et pour la PK2, les PVT ou les PVN (Cheng et al., 2002 et 2005).

III. Les bases moléculaires de la rythmicité circadienne dans les NSC

A. Les « gènes horloges »

Les bases moléculaires de la rythmicité circadienne font intervenir plus d'une dizaine de gènes appelés « gènes horloges » qui s'organisent en boucles de régulations transcriptionnelles positive et négative (pour revue : Reppert et Weaver, 2002) (cf. figure 6).

1. La boucle de rétrocontrôle positive

Cette boucle de régulation fait intervenir en partie le gène *clock* (circadian locomotor output cycles kaput). C'est le premier gène horloge, caractérisé chez un Mammifère. Ce gène a été isolé en recherchant chez des souris mutées de façon aléatoire, un ou plusieurs individus présentant une désorganisation des rythmes circadiens (Takahashi et al., 1994 ; Vitaterna et al., 1994). A partir de l'obtention d'une souche mutante, la même équipe a ensuite caractérisé la structure moléculaire du gène *clock* et de la protéine traduite (King et al., 1997 ; Antoch et al., 1997). *Clock* est très fortement exprimé dans les NSC ainsi qu'en dehors du système nerveux central comme dans le cœur, le foie, les reins et les gonades (King et al., 1997). Chez les rongeurs, l'expression de *clock* et de sa protéine dans les NSC, est arythmique en LD comme en DD (Tei et al., 1997 ; Shearman et al., 1997 ; Oishi et al., 1998 ; Maywood et al., 2003). En revanche, dans le foie, son expression est dépendante du temps avec un maximum d'ARNm vers ZT 23-ZT 01 (Lee et al., 2001 ; Preitner et al., 2002). Des souris ayant une invalidation du gène horloge *clock* ont une période d'activité locomotrice diminuée lorsqu'elles sont placées en libre cours (Gekakis et al., 1998 ; King et al., 1997 ; Antoch et al., 1997). De plus quand ce libre cours se prolonge, on voit apparaître une arythmie de l'activité locomotrice. Ces souris présentent des niveaux faibles d'ARNm de tous les autres gènes horloges montrant ainsi l'implication de *clock* dans la régulation positive de la transcription des gènes horloges (Shearman et al., 2000a ; Kume et al., 1999 ; Jin et al., 1999 ; Oishi et al., 2000).

Le second gène de cette boucle moléculaire est le gène *bmali* (brain and muscle ARNt like protein1, aussi appelé MOP3 ou ARNT1). L'expression de *bmali* présente des variations rythmiques avec une maximum d'expression vers ZT 15-18 (Shearman et al., 2000a ; Honma

et al., 1998 ; Oishi et al., 1998 et 2000 ; Abe et al. 1998). Les mutants de ce gène sont immédiatement arythmiques lorsqu'ils sont placés en DD. La rythmicité en LD de ces souris est également fortement affectée (les souris sont moins actives de nuit et présentent une activité locomotrice anormalement élevée durant la période lumineuse). Chez ces souris, l'ARNm de l'ensemble des autres gènes horloges est exprimé dans les NSC de façon arythmique. Ces deux paramètres (activité locomotrice et niveaux d'expression des autres gènes horloges) font de *bm11*, comme pour *clock*, un composant essentiel du fonctionnement moléculaire de l'horloge et du comportement circadien de l'animal.

Les protéines de ces deux gènes appartiennent à la famille des facteurs de transcription au domaine bHLH (basic helix loop helix) et PAS (period-arnt-sim) permettant respectivement, leur fixation à l'ADN et leur dimérisation (Hogenesch et al., 1997 et 1998 ; King et al, 1997 ; Antoch et al., 1997). Le dimère CLOCK/BMAL1 (C/B) se lie à une séquence connue sous le nom d'*e-box* : CACGTG pour provoquer une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes horloges et des gènes de sortie de l'horloge (clock controlled genes : CCG ; cf. § III.E ; Sangoram et al., 1998 ; Jin et al., 1999 ; Gekakis et al., 1998 ; Hogenesch et al., 1998). Les séquences bHLH et PAS sont donc essentielles aux actions des dimères C/B. En effet, une mutation du domaine bHLH de BMAL1 n'empêche pas la dimérisation avec CLOCK mais supprime la trans-activation (Hosoda et al., 2004). Les taux de fixation de C/B à l'ADN ne seraient pas variables au cours du temps pour certains auteurs (Lee et al., 2001) et pour d'autres présenteraient une rythmicité avec un maximum en fin de nuit (Ripperger et Schibler, 2006). Enfin, récemment il a été montré que CLOCK présente dans sa partie C-terminale, une fonction histone acétylase (HAT) nécessaire à la plasticité du contrôle transcriptionnel (Doi et al., 2006). Cette découverte a montré l'importance du remodelage de la chromatine dans la régulation de la transcription des gènes appartenant au cœur de l'horloge moléculaire circadienne, et le lien entre l'acétylation des histones et la physiologie cellulaire.

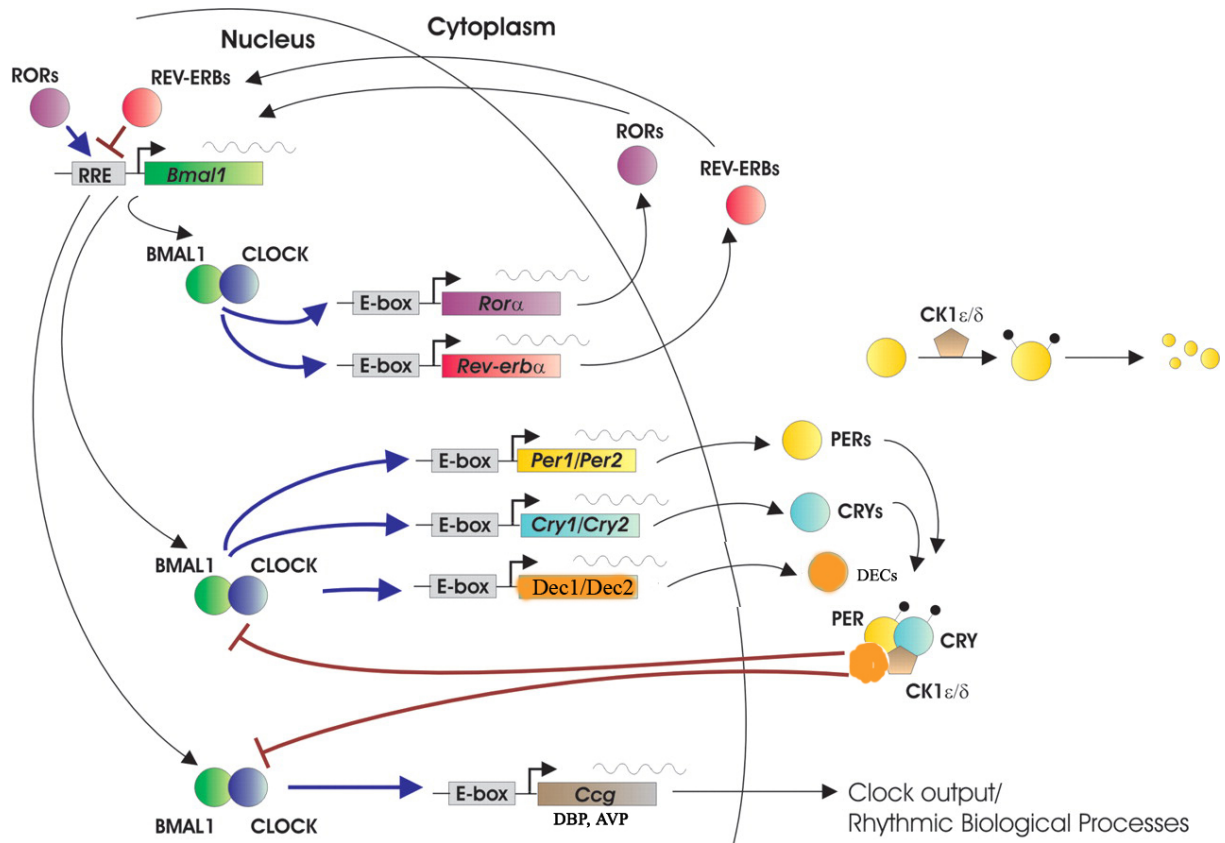


Figure 6 : Modèle des boucles moléculaires de régulations transcriptionnelle et traductionnelle des gènes horloges chez les Mammifères.

Un dimère de facteurs de transcription C/B initie la transcription d'un ensemble de gènes possédant une *e-box*. Parmi ces gènes se trouvent *per1*, 2 et 3, *cry1* et 2, *dec1* et 2, *rev-erbα* et fort probablement *roraα*. D'autres gènes tels que l'AVP ou *dbp* possèdent des *e-box* et sont aussi sous le contrôle transcriptionnel de C/B. L'ensemble de ces gènes est regroupé sous le nom de *cgc*. Les protéines PER et CRY (en association possible avec DEC) subissent des phosphorylations responsables, au moins partiellement, du contrôle temporel de leurs interactions et translocations nucléaires. Dans le noyau, ces dimères inhibent la transcription induite par le dimère C/B. REV-ERBα inhibiteur et RORα activateur de la transcription de *bmal1* constituent une seconde paire de boucles, et jouent également un rôle dans la rythmicité circadienne.

(d'après Ko et Takahashi, 2006)

Il existe différents types d'*e-box* : les *e-box* canoniques ou *e-box* véritables de séquence CACGTG et des motifs *e-box like* (ou *e-box* non-conservées) de séquence générale CAXxTG, où x est l'une des quatre bases. Les *e-box* peuvent être trouvées en positions variables telles que dans le promoteur ou dans les introns. L'action de protéines bHLH telles que CLOCK et BMAL1 sur ces *e-box* se traduit par une activation de la transcription du gène. La présence d'une *e-box* dans le promoteur d'un gène n'est cependant pas un critère suffisant, ni même nécessaire, à l'expression rythmique d'un gène. En effet, des études utilisant des puces à ADN ont montré que de nombreux gènes vraisemblablement dépourvus d'*e-box* peuvent présenter un rythme circadien ce qui semble indiquer un contrôle indirect du mécanisme de l'horloge sur leur transcription. (Mitsui et al., 2001 ; pour revue : Morse et Sassone-Corsi, 2002 ; Delaunay et Laudet, 2002).

2. La boucle de rétrocontrôle négative

La boucle négative est constituée en partie par la famille des gènes *period* (*per*). Les trois gènes *per1*, *2* et *3* sont décrits chez la plupart de Mammifères (sauf l'homme qui en présente un quatrième). *Per1* est le premier à avoir été découvert puis *per2* et *per3* ont été clonés par homologie de séquence avec *per1*. Ils sont tous les trois exprimés au niveau nerveux dont les NSC, ainsi que dans de nombreux tissus périphériques (Albrecht et al., 1997; Shearman et al., 1997 ; Zylka et al., 1998a ; Takumi et al., 1998a). L'expression de ces 3 gènes est rythmique (pic à ZT 2-6 pour *per1*, à ZT 6-12 pour *per2* et à ZT 6-9 pour *per3*) (Sun et al., 1997; Tei et al., 1997 ; Hastings et al., 1999) et elles sont décalées de 4 heures environ dans les tissus périphériques (Sun et al., 1997). L'expression de leurs protéines est aussi rythmique et présente un maximum à la transition jour/nuite (Field et al., 2000). Le promoteur du gène *per1* contient 5 *e-box* (Gekakis et al., 1998 ; Yamaguchi et al., 2000) dans la région 5'. De même, les promoteurs de *per2* et de *per3* contiennent respectivement 7 et 4 motifs *e-box like* (Travnickova-Bendova et al., 2002). Les PER, tout comme CLOCK et BMAL1 sont des protéines à domaine PAS (Hastings et al., 1999 ; Field et al., 2000). Toutes les souches mutantes pour les gènes *per* présentent une diminution de la période d'activité locomotrice, sauf les mutants *per3* (Cermakian et al., 2001 ; Bae et al., 2001 ; Albrecht et al., 2001 ; Zheng et al., 1999 ; Shearman et al., 2000b). Cependant, les souris ayant une délétion à la fois pour *per1* et *per2* deviennent arythmiques lorsqu'elles sont placées en DD (Bae et al., 2001).

Famille de protéines	Gène	ARNm (pic)	Protéine (pic)
Protéines à domaine PAS	<i>period1</i> <i>period2</i> <i>period3</i>	ZT 4-6 ZT 8-12 ZT 6-9	ZT 10-14
	<i>timeless</i>	Pas de rythme	Pas de rythme
Flavoprotéines	<i>cryptochrome1</i> <i>cryptochrome2</i>	ZT 12 Pas de rythme ou ZT 12	ZT 12
Protéines à domaine bHLH	<i>dec1</i> <i>dec2</i>	ZT4-6	
Kinases	<i>caséine kinase Iε</i>	Pas de rythme	
	<i>caséine kinase Iδ</i>	Pas de rythme	
Protéines à domaines bHLH et PAS	<i>clock</i>	Pas de rythme	Pas de rythme
	<i>MOP3=bmall</i>	ZT 15-18	ZT 4
Protéines à domaine bZIP Récepteur nucléaire orphelin,	<i>rev-erba</i>	ZT 2-6	
	<i>rora</i>	ZT 12	

Tableau 1 : Récapitulatif comparatif des gènes de l'horloge chez les Mammifères

Plusieurs études suggèrent que les gènes *per1* et *per2* jouent un rôle important dans l'apparition d'avance et de retard de phase de l'activité locomotrice en réponse à un créneau lumineux appliqué pendant la phase nocturne. En effet, les gènes *per1* et *per2* sont induits de manière transitoire par la lumière durant la nuit de façon phase-dépendante chez le rat (Yan et al., 1999, Miyake et al., 2000) alors que *per3* n'est jamais induit par un créneau lumineux (Zylka et al., 1998a ; Takumi et al., 1998b). L'implication de *per1* et *per2* a été confirmée par l'utilisation des α Oligodéoxynucléotides (α ODN) dirigés contre ces gènes et qui inhibent alors l'apparition des décalages de phase (Akiyama et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001; Tischkau et al., 2003). *Per1* et *per2* semblent être induits par le glutamate (GLU), principal neurotransmetteur du RHT, ou le PACAP, neuropeptide co-localisé avec le GLU dans le RHT (Nielsen et al., 2001 ; Minami et al., 2002). L'induction photique de *per1* se ferait grâce à la présence d'un CRE (cAMP response element) fonctionnel présent dans les promoteurs de *per1* et de *per2* mais pas dans le promoteur de *per3*, ce qui pourrait expliquer l'absence d'induction de *per3* par la lumière (Yokota et al., 2001 ; Travnickova-Bendova et al., 2002). Physiologiquement, l'activation des récepteurs glutamatergiques par la lumière entraîne la phosphorylation de CREB (cAMP response element binding protein) qui vient se fixer sur la séquence CRE des gènes pour activer leur transcription (pour revue, Lonze et Ginty, 2002). Une autre voie passant par la calcium calmoduline kinase II (CaM kinase II) et de la protéine kinase GII (PKGII) semble également impliquée dans les inductions de *per1* et *per2* (Nomura et al., 2003 ; Oster et al., 2003). Des souris ayant une invalidation pour les gènes *per1* ou *per2* ne présentent plus d'avance ou de retard de phase, respectivement (Albrecht et al., 2001).

Il est cependant important de noter que, malgré une induction très importante de l'expression des gènes *per1* et *per2*, il semble qu'il existe des mécanismes post-transcriptionnels de régulations puisque l'augmentation attendue d'immunoréactivité pour les protéines correspondantes, soit n'est pas observée dans le cas de PER2, soit intervient 6-9 h après le créneau lumineux, dans le cas de PER1 (Field et al., 2000 ; VonGall et al., 2003), privilégiant ainsi l'implication de *per1* plutôt que celle de *per2*, dans les décalages de phase d'activité locomotrice. De ces diverses études, il découle que les décalages de phase de l'activité locomotrice induits par des créneaux lumineux pendant la nuit seraient dus à *per1* pour les avances de phase et à *per1* et *per2* pour les retards de phase. Cependant ces conclusions sont sujettes à discussion car des résultats très différents ont été récemment publiés. En effet, des souris ayant une invalidation pour *per1* sont entraînaibles par un créneau de lumière (Cermakian et al., 2001). Un créneau lumineux de 6 heures à ZT 14 appliqué à des

souris en LD 12 : 12, entraîne une augmentation très largement significative du nombre de cellules immunoréactives pour PER1 comme pour PER2 (Harmar et al., 2002).

Les *cryptochromes* (*cry*) *cry1* et *cry2* sont des flavoprotéines identifiées tout d'abord chez les plantes (Cashmore et al., 1999). Ces protéines sont des homologues structuraux des enzymes réparant l'ADN, les DNA photolyases, mais ayant perdu leur activité de réparation. *Cry1* et *cry2* sont exprimés dans de nombreuses structures centrales dont les NSC et aussi périphériques (Miyamoto et Sancar, 1998). Dans le cas de *cry1*, l'expression est rythmique et endogène, et le maximum d'expression de l'ARNm se retrouve à la transition jour/nuit (Miyamoto et Sancar, 1998 ; Kume et al., 1999 ; Okamura et al., 1999). Les données concernant les niveaux d'ARNm de *cry2* sont discordantes; les niveaux d'ARNm pouvant être constants (Miyamoto et Sancar, 1998 ; Kume et al., 1999) ou rythmiques avec un maximum d'expression à la transition jour/nuit (Okamura et al., 1999). Les protéines CRY ont une expression rythmique avec des valeurs maximales à la transition jour/nuit (Kume et al., 1999). Les simples mutants présentent une modification de la période d'activité locomotrice alors que les doubles mutants sont arythmiques dès qu'ils sont placés en obscurité constante (Van der Horst et al., 1999).

Les protéines PER et CRY s'hétérodimérisent afin de former des complexes PER/CRY qui pourront pénétrer dans le noyau (pour revue Reppert et Weaver, 2002). Une fois dans le noyau, les protéines horloges de la boucle négative inhibent leur propre transcription en bloquant l'action des dimères C/B. Les taux des ARNm des gènes *per* et des gènes *cry* diminuent et les protéines PER et CRY vont être dégradées durant la fin de la nuit. Parallèlement, le tau de BMAL1 augmente, atteignant son maximum d'expression au moment où les PER et les CRY sont dégradées. Les rôles opposés, joués par les dimères PER/CRY et par le dimère C/B, associés à la liaison constante de C/B au promoteur de *per1* sont sûrement indispensables à la précision du rythme. En fin de nuit, les gènes horloges *per* et *cry* présentent leurs valeurs minimales d'ARNm, *bmal1* et C/B ne sont plus inhibés et un nouveau cycle peut recommencer.

3. Les gènes de sortie de l'horloge

L'hétérodimère C/B se fixe sur la séquence *e-box* des gènes dont la transcription est régulée directement par les gènes de l'horloge, appelés gènes contrôlés par l'horloge : CCG

qui sont des sorties directes de l'horloge, dont l'expression est le reflet direct du fonctionnement de l'horloge. Le premier CCG découvert est l'AVP (Jin et al., 1999), l'expression de son ARNm est couramment utilisée comme un marqueur du temps circadien dans de nombreuses études. On étudie également *dbp* (albumine gène D-site binder protéine) et *pk2*. Tous les trois présentent des *e-box* dans leur promoteur et des rythmes d'expression journaliers dans les NSC (Jin et al., 1999 ; Yamaguchi et al., 2000 ; Cheng et al., 2002 et 2005).

4. Les autres partenaires potentiels des gènes horloges

DEC1 (differentiated embryo chondrocyte protein) et DEC2 sont des facteurs de transcription possédant un domaine bHLH, mais ne possédant pas de domaine PAS et qui peuvent se fixer sur les mêmes séquences consensus que le dimère C/B (Honma et al., 2002). Ils sont exprimés dans les NSC de manière rythmique, avec un pic pendant le jour (ZT 2-6 pour *dec1* et ZT 6 pour *dec2*). Ces deux gènes sont exprimés de manière circadienne aussi dans des tissus périphériques, avec un maximum d'expression à la transition jour/nuite, et en un décalage par rapport aux NSC de 6-8 heures (Honma et al., 2002). Ces protéines incapables d'activer la transcription pourraient jouer le rôle d'inhibiteur compétitif du dimère C/B. Par ailleurs, les DEC peuvent aussi interagir avec la partie N-terminale de BMAL1, et empêcher ainsi le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Sato et al., 2004a). En se basant sur le modèle établi chez la drosophile, un homologue du gène *timeless* a été identifié chez les Mammifères par plusieurs équipes (Koike et al., 1998 ; Sangoram et al., 1998 ; Zylka et al., 1998b). Comme les autres gènes de l'horloge, *tim* est exprimé dans les NSC, mais les résultats sont contradictoires : il peut être exprimé faiblement et ne pas osciller (Hastings et al., 1999 ; Field et al., 2000), ou présenter un rythme journalier d'expression et être inductible par la lumière (Tischkau et al., 1999). Il apparaît aujourd'hui qu'en fait *tim* n'est pas l'homologue de *dtim*, mais d'un autre gène nommé *timeout*, et que les protéines TIM ne se lient pas aux protéines PER (Field et al., 2000 ; Gotter et al., 2000 ; Kume et al., 1999). Cependant, TIM peut se lier à CRY1 et CRY2 (Kume et al., 1999 ; Field et al., 2000). De même, on observe la perte du rythme d'activité électrique des NSC après ajout d' α ODN *tim* mais également un déphasage de ce rythme (Barnes et al., 2003). Ces résultats tendent à prouver que TIM peut moduler les interactions entre les cryptochromes et les autres protéines impliquées dans le cœur de l'horloge. TIM peut également inhiber la transcription induite par

le dimère C/B (Kume et al., 1999 ; Jin et al., 1999). En résumé, le rôle de TIM dans l'horloge des Mammifères demeure encore énigmatique (pour revue voir Gotter, 2006).

B. Les « récepteurs orphelins »

1. Généralités

La famille des « récepteurs orphelins » compte actuellement près de 200 membres, dont la plupart sont considérés comme « orphelins ». Leur découverte est basée sur la conservation du domaine de fixation à l'ADN des récepteurs hormonaux, par criblage de banques d'ADNc de différentes espèces dont le rat. (Pour revue : Smirnov, 2001). Le terme « orphelin » est utilisé pour décrire des récepteurs pour lesquels aucun ligand endogène n'a encore été découvert. Les deux sous-familles de récepteurs orphelins auxquelles nous allons nous intéresser sont **la famille des gènes REV-ERB** et celle des gènes codant pour **les retinoic acid related orphan receptors (ROR)**.

La structure des récepteurs ROR et REV-ERB est typique des récepteurs nucléaires. Elle inclut 11 exons et un domaine de fixation à l'ADN en forme de deux doigts de zinc (Hirose et al., 1994 ; Giguere et al., 1995 ; Medvedev et al., 1997). La protéine se divise en plusieurs domaines : le domaine A/B variable au niveau de la séquence en N-terminal possédant la fonction activatrice constitutive AF1 (activating function : AF) ; un domaine C de fixation à l'ADN conservé ; une séquence charnière variable D ; une séquence E permettant la fixation du ligand bien conservée et enfin un domaine court optionnel F. La séquence E contient la fonction régulatrice AF2 qui peut être très différente d'une protéine à l'autre (Vu-Dac et al., 1997). En effet, cette séquence peut fonctionner seule comme c'est le cas pour ROR α 1 (Atkins et al., 1999) ou nécessiter un co-activateur comme c'est le cas de ROR β (Greiner et al., 1996). Elle peut aussi être absente comme c'est le cas pour les récepteurs REV-ERB (Bonnelye et al., 1994 ; Renaud et al., 2000). Bien que le domaine C soit l'authentique domaine de fixation à l'ADN, des séquences voisines attenantes au domaine régulateur AF1 en N-terminal et la séquence charnière D, participent également à la reconnaissance de la séquence RORE (ROR response element). La partie charnière D de la protéine, en fonction des délétions et des mutations, joue en effet, un rôle primordial dans la reconnaissance de la séquence de fixation à l'ADN (Giguere et al., 1994 et 1995).

2. La fixation à la séquence RORE

Il existe différents sites de régulations transcriptionnelles sur les séquences promotrices des gènes par les protéines ROR et REV-ERB. Ces sites suggèrent que ces protéines puissent être des facteurs de transcription. Ils sont à chaque fois composés de deux demi-sites A/GGGTCA palindromiques séparés par une ou plusieurs bases (cf. tableau 2).

Nom	protéines	Séquence (5' → 3')
Rev-DR1 (PPRE)	PPAR	A/T riche – (A/G)GGNCA N AG(G/T)TCA
Rev-DR2 (Rev-RE)	ROR, REV-ERB, PPAR	A/T riche – AGGTCA NN AGGTCA
Rev-DR (RORE)	ROR et REV-ERB	A/T riche – AGGTCA

Tableau 2 : Tableau représentant les sites de régulation par les récepteurs orphelins tels que ROR, REV-ERB et PPAR.

Les protéines ROR et REV-ERB peuvent également se fixer à l'ADN sous la forme d'un monomère et reconnaissent une séquence dite RORE. Cette séquence reprend ce demi-site A/GGGTCA avec une séquence terminale riche en A/T en 5'. Dans une culture de CV1 (cellules de rein de singe), des constructions hybrides des récepteurs ROR β semblent également capables de se fixer sous la forme d'un homodimère à une séquence REV-DR1 permettant la fixation d'une seconde molécule ROR β (Carlberg et al., 1994 ; Greiner et al., 1996). Il faut cependant noter qu'aucune coopération, dans la fixation sur l'ADN, entre ces deux protéines ROR β n'a jamais été démontrée. L'existence d'une paire de séquences RORE a été trouvée dans de nombreuses séquences promotrices de gènes permettant l'activation de la transcription de gènes tel que *bmall* par *rora* (Sato et al., 2004b). De plus, certaines de ces protéines sont capables de s'autoréguler et aussi de se réguler entre elles. En effet, deux sites RORE ont été trouvés sur les promoteurs de *rora1* et *rev-erba* permettant à ce dernier d'inhiber la transcription de *rora1* et sa propre transcription (Forman et al., 1994).

3. Les gènes *rev-erb*

REV-ERB α est aussi appelé NR1D1 (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1) (Evans et al., 1988 ; Green et Chambon, 1988). *Rev-erba* est exprimé à la fois au niveau central et au niveau périphérique. Au niveau central, on le détecte dans de nombreuses structures du cerveau, des bulbes olfactifs à la moelle épinière. Un fort niveau d'expression est observé dans les couches internes granulaires, le cortex cérébral ou les noyaux thalamiques. Cependant, les NSC sont la structure centrale où le niveau d'expression de *rev-erba* est le plus élevé (Onishi et al., 2002). Au niveau périphérique, il est également exprimé dans le cœur, le foie, les tissus adipeux bruns, les muscles squelettiques et les reins (Lazar et al., 1989).

Le gène *rev-erba* est transcrit sur le brin non codant pour le récepteur de l'hormone thyroïdienne T3 (Benbrook et Pfahl, 1987 ; Mitsuhashi et al., 1988 ; Thompson et al., 1987). Chez le rat ou l'homme, le gène *rev-erba* donne deux ARNm avec une région 5' différente. Cette différence se traduit par des régions protéiques N-terminal différentes et des domaines A/B également différents. (Lazar et al., 1989 ; Miyajima et al., 1989 ; Laudet et al., 1991 ; Dumas et al., 1994). La forme longue majoritaire possède le premier exon absent de la forme courte minoritaire. La forme longue de la protéine peut se traduire en deux isoformes : E1A et E1B (cf. figure 7) dont les rôles et les régulations spécifiques ne sont pas encore connus.

a. Fonction circadienne

➤ Une nouvelle boucle négative

En 2002, Preitner et ses collaborateurs, par une étude à la fois moléculaire et physiologique ont été les premiers à montrer le rôle de REV-ERB α dans la régulation de *bmal1*. En effet, ils ont observé que les rythmes d'expression d'ARNm de *bmal1* et de traduction de la protéine REV-ERB α sont en opposition de phase. Ils ont également démontré la fixation de REV-ERB α , sur la séquence RORE de *bmal1* permettant sa régulation transcriptionnelle. Ce n'est donc que très récemment que le récepteur nucléaire orphelin *rev-erba* a été proposé comme un composé essentiel des boucles d'oscillations circadiennes qui contrôlent l'expression cyclique de *bmal1* à la fois dans les NSC mais également dans les tissus périphériques comme le foie (Etchegaray, 2003 ; Preitner et al., 2002 ; Ueda et al., 2002). Dans les NSC, *rev-erba* présente un maximum d'expression en début de jour à ZT 04

et un minimum d'expression en milieu de nuit vers ZT 12 à la fois en LD et en DD (Onishi et al., 2002). Par ailleurs, un flash lumineux d'une demi-heure de 300 lux à CT 16 connu pour induire un retard de phase maximal du rythme d'activité locomotrice de la souris et une augmentation importante du niveau d'expression de *per1* (Shigeyoshi et al., 1997), n'a aucun effet sur le niveau d'expression d'ARNm de *rev-erba* dans les NSC (Onishi et al., 2002). Ce qui signifie *rev-erba* n'est pas induit par la lumière en début de nuit, contrairement à *per1*. Chez la souris, le rythme d'expression de *rev-erba* est retardé de 8 heures avec une amplitude diminuée par une invalidation du gène *clock* ou avancé par une délétion du gène *per* (Triqueneaux et al., 2004). De plus, chez des souris doubles mutantes à la fois pour le gène *per2* et pour le gène *per1*, l'expression *rev-erba* devient uniquement constitutive (Preitner et al., 2002). L'ensemble de ces résultats montre que la régulation de *rev-erba* est à la fois sous contrôle de la boucle positive (par le dimère C/B) et de la boucle négative (par les protéines PER) et que ce gène est au cœur des boucles moléculaires circadiennes.

➤ La souche de souris KO *rev-erba*

Il existe une souche de souris présentant une délétion pour le gène *rev-erba* où le niveau d'expression de *bmal1* est fortement diminué (20 fois moins de copies d'ARNm de *bmal1* chez les KO *rev-erba* que chez les souris sauvages). Cette invalidation de *rev-erba* a des conséquences sur les niveaux d'expression des gènes *clock* et *cry1* dans les NSC, mais pas sur le rythme d'expression de *cry2* et *per2*. Ces souris placées en DD ou LL n'ont pas un comportement arythmique mais présentent une diminution de leur période d'activité locomotrice (Preitner et al., 2002). De plus, la distribution des périodes individuelles est très dispersée. Si ces souris restent en DD pendant au moins 7 jours, leur réponse à un flash lumineux à CT 22, point horaire où la réponse à la lumière est maximale, présente une avance de phase cinq fois plus grande (5.4 heures) que celle obtenue chez des animaux sauvages (1.1 heure) (Preitner et al., 2002). Ces résultats montrent que *rev-erba* n'est pas essentiel à l'expression de la rythmicité, il n'est donc pas au cœur des boucles positive et négative de transcription de l'horloge mais il a un rôle régulateur incontournable.

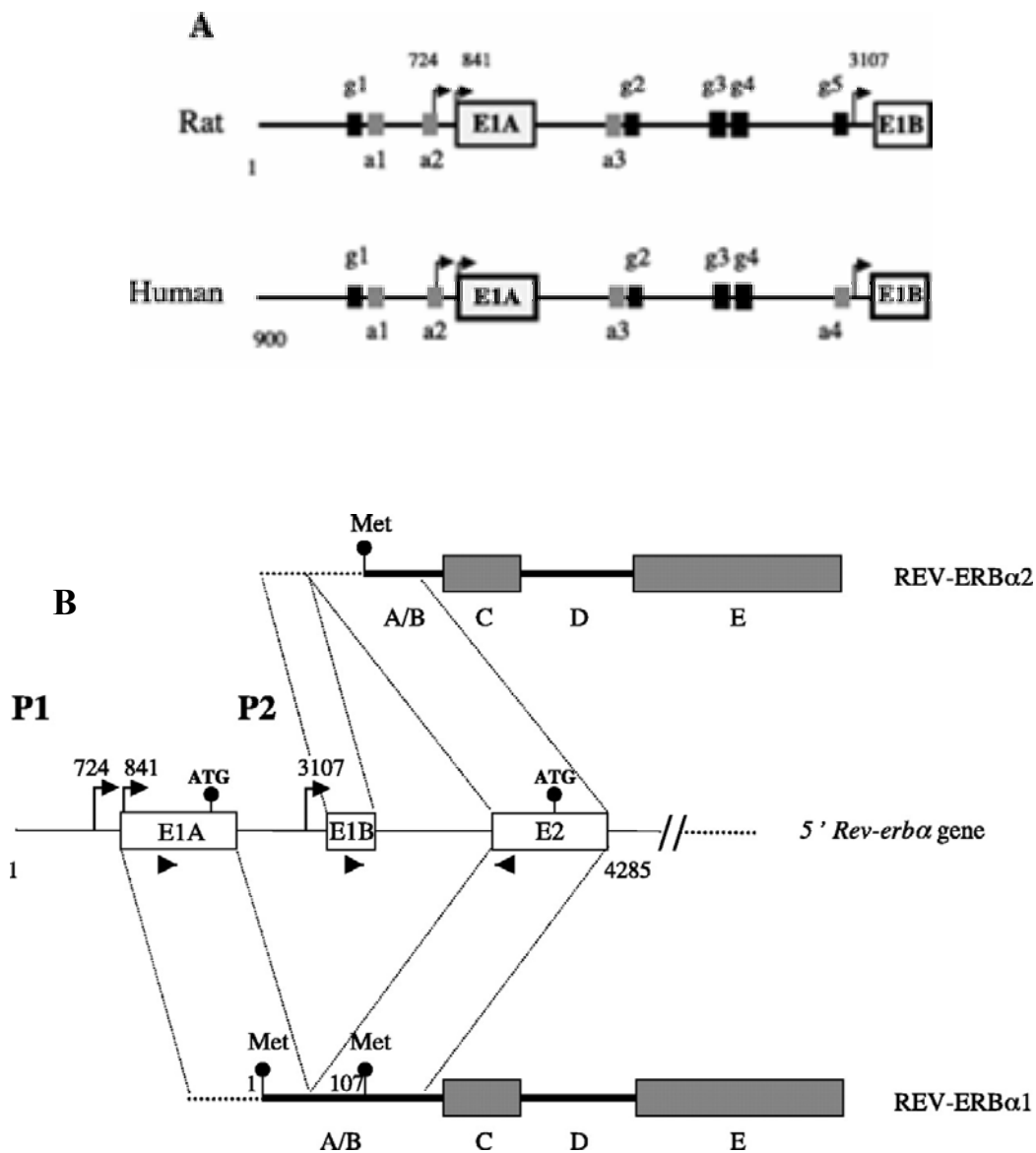


Figure 7: Le promoteur de rev-erba

(A) Localisation des *e-box* sur le promoteur de *rev-erba* chez l'homme. Les *e-box* conservées sont représentées par des carrés noirs et les *e-box* non conservées par des carrés gris

(B) Le promoteur du gène *rev-erba* code pour deux isoformes ayant une séquence N-terminale, *rev-erba1* et *rev-erba2*, issus de deux promoteurs différents, P1 et P2. Les sites d'initiation de la transcription sont indiqués par une flèche coudée, et les séquences non transcrites par des lignes en pointillées alors que les séquences transcrites par des lignes pleines. Le codon d'initiation de la traduction est représenté par un cercle (●) ce qui montre que l'ARNm de *rev-erba1* peut générer les deux isoformes par une utilisation alternative des codons d'initiation de la traduction.

(d'après Triqueneaux et al., 2004)

➤ Régulation de l'expression du gène *rev-erba*

L'expression de *rev-erba* est principalement sous le contrôle d'*e-box* (cf. III.A.1) présentes sur son promoteur qui se subdivisent en deux sous-groupes : P1 qui est une séquence assez éloignée du site initiateur de la transcription et P2 comprenant le point de départ de la transcription du gène et une partie du premier intron (cf. figure 7). Ces séquences sont plus ou moins conservées selon les espèces. La séquence P1 comporte une *e-box* conservée et deux autres divergentes retrouvées à la fois chez la souris et le rat. La séquence P2 quant à elle, comporte 3 *e-box* conservées et une divergente. Cette partie promotrice se retrouve à la fois chez le rat, la souris et l'homme. Enfin une dernière séquence *e-box* très conservée est retrouvée dans la séquence promotrice chez les rongeurs alors qu'elle est assez divergente chez l'homme (Triqueneaux et al., 2004).

Triqueneaux et collaborateurs ont étudié *in vitro* l'implication de ces *e-box* dans le rythme journalier d'expression de *rev-erba* dans deux lignées de fibroblastes de rats : les lignées 3Y1-cells et Rat1-cells. (Triqueneaux et al., 2004). Un choc au sérum synchronise l'ensemble des cellules en culture. Les deux isoformes de *rev-erba* ont une réponse différente. En effet, alors que le rythme d'expression de *rev-erba1A* est transitoirement inhibé celui de *rev-erba1B* est brièvement activé. La présence conjointe des promoteurs respectifs des deux isoformes de *rev-erba* n'accroît pas le niveau d'activation de la transcription de *rev-erba* par le dimère C/B. Il existe cependant une prédominance d'une des *e-box* non conservées dans le promoteur P1. En effet, seule une mutation de cette *e-box* est capable d'abolir l'activation transcriptionnelle par le dimère C/B. Cette séquence déjà présentée comme un site transcriptionnel majeur chez l'homme n'est que mineure chez le rat (Adelmant et al., 1996). La séquence P1 comporte de plus une séquence palindromique REV-DR2 et une séquence monomérique permettant aux peroxisomes proliferator activated receptors (PPAR) (voir § III.C), activés par les fibrates, molécule exogène hypolipémiante, ainsi qu'aux protéines ROR, d'agir sur le niveau de transcription de *rev-erba* (Vu-Dac et al., 1998).

➤ Régulation transcriptionnelle de *bmal1*

Rev-erba est l'un des seuls récepteurs orphelins qui a perdu sa fonction AF2 nécessaire à son activation par un ligand (Harding et Lazar, 1995 ; Hu et Lazar, 2000). Par conséquent, *rev-erba* se comporte constitutivement comme un récepteur sans ligand, et réprime la transcription de ses gènes cibles en se liant initialement à des molécules co-

répressives (Harding et Lazar, 1995 ; Hu et Lazar, 2003 ; Ishizuka et Lazar, 2000). Parmi elles, *rev-erba* recrute préférentiellement le co-répresseur NCoR (Hu et al., 2001 ; Zamir et al., 1996 et 1997) qui se fixe à un complexe multi-protéique incluant l'histone désacétylase 3 (HDAC3) (Ishizuka et Lazar, 2003 ; Guenther et al., 2000 et 2001). Cette enzyme a pour rôle d'altérer localement la structure de la chromatine par une suppression des groupements acétyles des histones, il en résulte une structure qui réduit l'accessibilité de la machinerie basale de la transcription (Guenther et al., 2000 et 2001).

L'activité répressive de REV-ERB α est dose dépendant (Yin et Lazar, 2005 ; Guillaumond et al., 2005), et elle nécessite l'intégrité de sa partie C-terminal pour conserver son pouvoir de fixation aux co-répresseurs. En effet, la mutation de l'une ou l'autre des séquences RORE, diminue l'inhibition de l'expression de *bmal1* par REV-ERB α . Ainsi, seule la forme homodimérique de REV-ERB α est capable de recruter de façon stable le complexe protéique NCoR/HDAC3. Le recrutement de HDAC3 par REV-ERB α provoque une désacétylation des histones H3 et H4 dans la région promotrice de *bmal1* dont le niveau d'expression de son ARNm est augmenté quand on inhibe HDCA3 par siRNA. L'HDAC3 est donc impliquée dans la régulation de l'expression de *bmal1* par REV-ERB α (Gekakis et al., 1998 ; Etchegaray et al., 2003).

b. Fonction non circadienne

Rev-erba a également de nombreux rôles en dehors de sa fonction circadienne. Son rôle est toujours en opposition à celui de *rora* et de ses isoformes. Ceci s'explique simplement par le fait que les deux protéines de ce gènes se lient de façon compétitive sur les mêmes sites de régulation mais ensuite leurs actions y sont opposées puisque ROR α est activateur alors que REV-ERB α est inhibiteur (Raspe et al., 2002a).

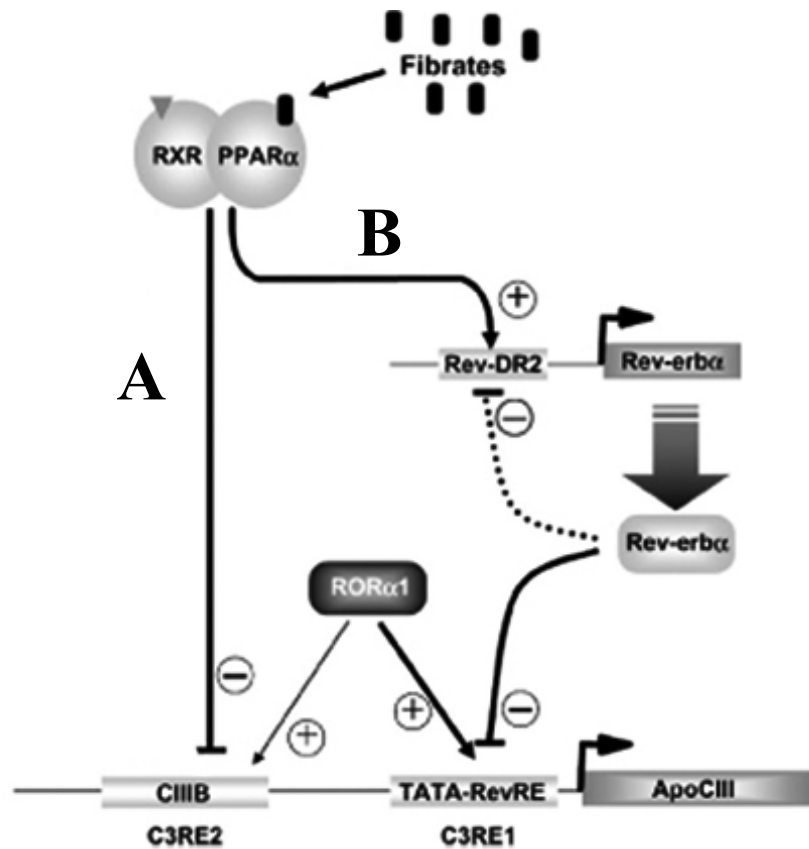


Figure 8: Rôle de rev-erba et rora dans l'homéostasie lipidique et la régulation de l'expression de l'apoCIII.

Après une activation par les fibrates, PPARα réprime l'expression de l'apoCIII soit par un mécanisme direct (A) en se fixant sur son site d'activation de la transcription empêchant ainsi l'activation de sa transcription par d'autres facteurs, soit par une cascade de transcription en plusieurs étapes (B). Le complexe PPARα/RXRα se fixe sur la séquence REV-DR2 de *rev-erba* pour activer sa transcription. La protéine REV-ERBα vient ensuite inhiber la transcription de l'apoCIII sur le site d'activation de RORα1. Enfin REV-ERBα entre en compétition avec le complexe PPARα/RXRα pour sa propre transcription. (Coste et Rodriguez, 2002)

➤ Régulation de l'homéostasie lipidique

Vu-Dac et ses collaborateurs ont montré que REV-ERB α régule l'expression des différentes apo-protéines dont l'apolipoprotéine AI (apoA1) et l'apoC3 (cf. figure 8). Cette protéine apoA1 est impliquée dans le contrôle du niveau de cholestérol libre dans les lésions artérosclérotiques chez les souris présentant une mutation pour la protéine apoE (Vu-Dac et al., 1998). De nombreux résultats confirment une interaction de REV-ERB α et PPAR α (cf. § III.C) dans l'homéostasie lipidique. En effet, *rev-erba* est régulé par les fibrates, agonistes des PPAR α et molécules hypolipémiantes (Fruchart et al., 1999 ; Canaple et al., 2006). Une fois activés, les PPAR α entrent en compétition avec REV-ERB α pour se fixer sur le site REV-DR2 du promoteur de *rev-erba* afin de l'activer (Gervois et al., 2000). Les fibrates régulent de façon différente le niveau d'apoA1 chez les hommes et les rongeurs. En effet, chez l'homme, le promoteur de *rev-erba* n'a pas la séquence régulatrice REV-DR2 présente chez le rat. De plus, le site PPAR α response element du promoteur de *rev-erba* n'est pas fonctionnel chez le rat. Ces différences provoquent une augmentation du niveau de l'apoA1 chez l'homme et une diminution chez le rat (Ramakrishnan et Muscat, 2006).

La protéine humaine REV-ERB α inhibe, à la fois chez l'homme et chez le rat, l'expression de l'apoC3 qui est un composant des HDL (high density lipoprotein) et des VLDL (very low density lipoprotein) régulant les niveaux sanguins de triglycérides (Coste et Rodriguez, 2002 ; Raspe et al., 2002a). De plus, les souris ayant une délétion pour le gène *rev-erba* présentent une augmentation des niveaux de VLDL, de triglycérides et d'apoC3 (Chomez et al., 2000 ; Raspe et al., 2002a) alors que les souris ayant une délétion pour le gène *rora* ont des niveaux sanguins très bas pour ces trois molécules (Laitinen et Staels, 2003).

➤ La différenciation adipocytaire

La différenciation des adipocytes est observée au niveau moléculaire par une activation des gènes spécifiques des adipocytes dont la régulation est faite par un certain nombre de facteurs de transcription dont ceux appartenant aux CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) et ceux appartenant à la famille des PPARs. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation précoce des pré-adipocytes 3T3 L1 en adipocytes chez les rongeurs. PPAR γ est un activateur puissant de l'adipogenèse, il est capable de transformer des fibroblastes, des hépatocytes ou des myoblastes en adipocytes en agissant sur de nombreux gènes dont *rev-erba* (Hu et al., 1995). Cet effet est observé à la fois *in vivo* (dans

les adipocytes) et *in vitro* (dans les cultures de cellules 3T3 L1), où PPAR γ active l'expression de *rev-erba* en se fixant sur la séquence REV-DR2 (revue : Laitinen et al., 2005). REV-ERB α active alors les marqueurs de la différenciation adipocytaire C/EBP α et PPAR γ (Cornelius et al., 1994 ; MacDougald et Lane, 1995 ; Tontonoz et al., 1995).

➤ La différenciation myoblastique

Rev-erba est fortement induit au cours de la myogénèse et dans les muscles squelettiques. *Rora*, également très fortement exprimé au cours de la myogénèse, semble être responsable de l'induction de *rev-erba*. Dans une culture de myoblastes de rat, une interaction entre *rora1* (une des 4 isoformes de *rora*, cf. § III.B.4.a) et *rev-erba* a été montrée. En effet, une transfection du gène *rora1* provoque une augmentation du niveau d'ARNm de *rev-erba*, ce qui n'est pas le cas pour les autres isoformes *rora* ou *rory*. Chez la souris *staggerer* (cf. § III.B.4.a) ayant une invalidation pour le gène *rora*, on observe une diminution du niveau d'expression de *rev-erba* (Delerive et al., 2002). Une étude a montré par mutagenèse dirigée, dans une culture d'hépatocytes, que deux séquences RORE, l'une proximale et l'autre distale sur le promoteur de *rev-erba*. Une mutation induite dans la séquence proximale ne provoque qu'une faible diminution du niveau d'expression de *rev-erba* alors qu'une mutation sur la séquence la plus distale, provoque une diminution drastique du niveau d'expression de *rev-erba* (Adelmant et al., 1996).

Il existe un second gène *rev-erb* : *rev-erb β* est exprimé dans de nombreux tissus mais son expression est maximale dans le cerveau (Enmark et al., 1994 ; Dumas et al., 1994 ; Forman et al., 1994 ; Bonnelye et al., 1994). Comme REV-ERB α , REV-ERB β est capable *in vitro*, d'inhiber la transcription de *bmal1* via les mêmes séquences RORE présentes sur le promoteur de ce gène et d'être ainsi en compétition avec ROR α (Guillaumond et al., 2005). Il présente également un rythme journalier de transcription avec un maximum d'expression pour ZT 6-10 en complète opposition de phase avec le rythme d'expression de *bmal1* (Preitner et al., 2002 ; Guillaumond et al., 2005). Cette opposition de phase de leur rythme de transcription suggère la présence d'une *e-box* sur son promoteur tout comme *rev-erba*.

4. Les gènes *ror*

Les protéines ROR, identifiées il y a près d'une vingtaine d'années, ne se différencient entre elles que par leur séquence N-terminale (Becker-André et al., 1994). Il existe trois gènes *ror*: *rorα*, *β* et *γ*. Depuis peu, *rorα* et *rorβ* ne peuvent plus être considérés comme des récepteurs orphelins car deux équipes ont découvert que le cholestérol, le cholestérol sulfate et tous les acides trans-rétinoïques sont des agonistes des récepteurs RORα et RORβ (Kallen et al., 2002 et 2004 ; Stehlin-Gaon et al., 2003).

a. Le gène *rorα*

RORα est ubiquitairement présent dans l'organisme et ceci a été démontré par différentes techniques d'exploration moléculaire (Matsui et al., 1995 ; Hazlerigg et al., 1996 ; Naji et al., 2004; Akashi et Takumi, 2005). En effet, *rorα* a été détecté à la fois dans le cerveau, les muscles et la peau par Northern blot (Matsui et al., 1995). Chez la souris, une expression de *rorα* au jour post natal P24 a été détectée par hybridation *in situ* dans les tissus nerveux suivant : la rétine, les bulbes olfactifs, les NSC, le cortex, l'hippocampe, le thalamus, la PT, les colliculus inférieurs et supérieurs, les cellules de Purkinje du cervelet, les noyaux trigéminal et vestibulaire médial (Matsui et al., 1995). Il existe 4 isoformes qui se distinguent par un domaine AB différent dans la partie N-terminal. *Rora1* et sa protéine ont été décelés dans des tissus périphériques : foie, cœur, tissus adipeux, peau, testicules, rein et rate, par RT-PCR et Western blot respectivement (Naji et al., 2004). Cependant la distribution des isoformes peut être différente avec des prédominances pour l'une ou l'autre dans un tissu donné. Dans le cervelet humain, les isoformes RORα1 et RORα4 sont prédominantes. Chez les rongeurs, RORα2 et RORα3 se retrouvent majoritairement dans les testicules et la forme RORα4 dans la peau et les leucocytes.

Rora présente un rythme d'expression à la fois en LD et en DD, avec un maximum d'expression vers le ZT 12 et un minimum à ZT 24 (Ueda et al., 2002 ; Sato et al., 2004b). RORα semble jouer un rôle important dans la modulation positive des rythmes circadiens dans les NSC (Emery et Reppert, 2004, Guillaumond et al., 2005). En effet, depuis peu, RORα est présenté comme le centre d'une seconde boucle positive de régulation de l'horloge moléculaire : une régulation transcriptionnelle de *bmal1* par RORα et un rétrocontrôle du rythme de transcription de *rorα* par le complexe C/B via une *e-box* putative située sur le

promoteur de *rora*, en sont de solides arguments (Sato et al., 2004b). ROR α et REV-ERB α sont en compétition sur la même séquence RORE du promoteur de *bmal1* (Preitner et al., 2002 ; Ueda et al., 2002). Des travaux portant sur les régulations transcriptionnelles de ces récepteurs orphelins dans des cellules d'hépatocytes en culture (HepG2), montrent une régulation de *rev-erba* par ROR α via une séquence REV-DR2 et inversement. Cette boucle de rétrocontrôle pourrait être également expliquer l'existence d'une expression rythmique de *rora* (Raspe et al., 2002b).

La souche de souris *staggerer* présente une maladie récessive autosomique qui provoque des problèmes dans le développement des cellules de purkinje et des interférences dans leur différenciation et leur survie (Sidman et al., 1962). L'arbre dendritique décrit par Purkinje en 1837 s'étale sur 300 à 400 micromètres de longueur dans le plan sagittal. Un tronc dendritique principal s'élève directement du pôle apical de la cellule, donnant quelques troncs dendritiques primaires. Ces derniers se ramifient en deux dendrites secondaires donnant naissance à de multiples arborisations tertiaires qui s'étendent dans toute l'épaisseur de la couche moléculaire. Enfin, les innombrables petites ramifications terminales sont recouvertes de milliers d'épines dendritiques (Berry et al., 1980). Ce phénotype naturel appelé « *staggerer* » est également retrouvé chez des souris ayant une invalidation du gène *rora* (Matysiak-Scholze et Nehls, 1997 ; Dussault et al., 1998 ; Doulazmi et al., 2001). Ces souris ayant une invalidation pour le gène *rora*, présentent aussi une diminution de la taille du cervelet surtout au niveau de la couche intermédiaire. La cyto-architecture de leur cervelet est très altérée, avec une couche moléculaire fine, et une organisation en mono-couche des cellules de purkinje absente. Enfin, la couche granulaire est quasi inexistante.

Ceci a mis en évidence l'importance du gène *rora* dans le développement et l'organisation du cervelet (Steinmayr et al., 1998). Une étude sur des cultures organotypiques de cervelet de souris *staggerer* montre qu'une transfection de *rora* via un lentivirus semble accélérer la différenciation des cellules vers les stades supérieurs. Une invalidation du gène *rora* empêcherait donc la différenciation du stade initial vers les stades supérieurs. Ceci est confirmé par le fait qu'une surexpression de *rora* n'induit pas une augmentation du nombre de cellules de purkinje, de la longueur dendritique ou de la surface de ces dendrites par rapport aux souris sauvages C57BL/6, mais joue un rôle déterminant dans le passage du premier stade de différenciation aux stades supérieurs. En conclusion, ROR α contrôle les étapes précoces de la différenciation dendritique.

L'étude de la souche *staggerer* a permis la découverte d'anomalies dans les rythmes circadiens et donc un rôle potentiel de *rora* dans les rythmes. Ces souris présentent un rythme d'activité locomotrice en LD 12 : 12. Cependant, lorsqu'elles sont placées en DD, elles ont une période plus courte que les souris sauvages. Ces résultats ont été obtenus chez des hétérozygotes (*sg/+*) car l'invalidation complète de ce gène entraîne de graves perturbations locomotrices chez les homozygotes rendant ainsi très difficile une telle étude. Cette souche a également une réponse aberrante à un flash lumineux. En effet, ces souris soumises à un flash lumineux ont une avance de phase de quatre heures de leur rythme d'activité locomotrice avec un ré-entraînement plus rapide dès les premiers cycles L/D. De plus, les souris placées en L/D 6 : 6, ont une réponse aberrante à la lumière suggérant que l'activité locomotrice puisse être inhibée par la lumière ou que ces souris deviennent arythmiques (Akashi et Takumi, 2005 ; Sato et al., 2004b). Enfin, les hétérozygotes *staggerer* présentent une adaptation plus rapide à un cycle altéré de lumière (Akashi et Takumi, 2005). En conclusion, ROR α pourrait donc être impliqué dans l'effet de la lumière et d'un flash lumineux seulement sur les NSC et les rythmes d'activité locomotrice. Cette souche présente également un niveau d'expression de *bmal1* réduit et depuis la démonstration de l'implication de ROR α dans les rythmes circadiens, des études ont approfondi le mode d'action de ROR α sur *bmal1* et ciblé en particulier l'isoforme responsable de cette action. Une étude a montré l'importance de ROR α 1 et de ROR α 4 dans l'activation de la transcription de *bmal1*. Mais ROR α 4 présente une action plus forte sur le site d'activation de la transcription de *bmal1* car seule une faible quantité de ROR α 4 suffit pour observer une augmentation très forte du niveau d'ARNm de *bmal1* (Nakajima et al., 2004).

Des travaux récents indiquent cependant que dans d'autres tissus, tels que le foie, *rora* ne présente pas d'oscillation circadienne. Cependant des travaux contradictoires existent telle qu'une expérience de RNase protection assay (RPA) qui montre une très légère oscillation du niveau d'ARNm de *rora* dans le foie (Balsalobre et al., 1998). Ceci suggère une implication possible des autres protéines ROR dans la régulation transcriptionnelle de *bmal1* (Akashi et Takumi, 2005 ; Sato et al., 2004b). En effet, par RT-PCR, un grand nombre de tissus périphériques présentent une arythmie de l'expression de *rora*. Ce n'est cependant pas le cas du cœur et des poumons qui restent rythmiques même en obscurité constante (Akashi et Takumi, 2005). L'action de ROR α se fait comme pour REV-ERB α par les séquences RORE situées sur le promoteur de *bmal1*. Une mutation de l'une ou l'autre des séquences RORE1 ou RORE2 du promoteur de *bmal1*, provoque *in vitro* une perte de rythmicité de l'expression de

bmal1. Ceci a permis de démontrer l'implication de *rorα* dans la régulation circadienne de *bmal1*, avec cependant un rôle majoritaire de RORE1, car l'invalidation des deux séquences RORE est nécessaire pour entraîner la perte complète de l'oscillation circadienne de *bmal1* (Akashi et Takumi, 2005).

b. Le gène *rorβ*

Contrairement aux autres gènes *ror*, *rorβ* est exprimé exclusivement dans le tube nerveux et plus particulièrement dans les structures sensorielles, neuroendocrines et le système limbique. Il n'y a pas d'expression de *rorβ* dans les neurones appartenant au système locomoteur ni au niveau des tissus périphériques (Park et al., 1996 et 1997). Il est également à noter que la majorité des cellules exprimant le récepteur orphelin RORβ expriment également le récepteur de la mélatonine MT₁ (cf. § IV.D.2) (Carlberg et Wiesenberg, 1995 ; Maywood et al., 1995 ; Song et al., 2000 ; Klosen et al., 2002).

L'expression de *rorβ* dans des structures directement impliquées dans la genèse et le contrôle des rythmes biologiques, suggère fortement que RORβ puisse être un effecteur ou un modulateur de ces fonctions rythmiques (Park et al., 1996 et 1997 ; Schaeren-Wiemers et al., 1997). De plus, dans les NSC, l'ARNm de *rorβ* présente un rythme d'expression avec un maximum vers ZT 04 et un minimum vers ZT 16, à la fois en LD et en DD (Sumi et al., 2002). Cependant, tout comme *rev-erba*, son expression n'est pas induite par un flash lumineux à CT 16 (Sumi et al., 2002). Enfin, par son action activatrice sur les séquences RORE de *bmal1*, Akashi et Takumi ont proposé que RORβ pouvait avoir un rôle redondant par rapport à RORα (Akashi et Takumi, 2005).

Les souris KO pour le gène *rorβ* présentent un phénotype correspondant à celui de la souche murine mutante de type *vacillans*, décrite il y a 40 ans (André et al., 1998a et 1998b). Ces animaux sont de petite taille, présentent un faible tonus musculaire et sont aveugles. Cette cécité confirme une implication de RORβ dans la prolifération des cellules souches rétiniennes (Chow et al., 1998). Toutefois, bien qu'aveugles (c'est à dire présentant un électrorétinogramme plat lors d'une stimulation lumineuse) elles sont entraînables par le cycle LD et demeurent rythmiques en DD. Les conséquences d'une délétion de ce gène sur la période du rythme de l'activité locomotrice pourraient confirmer une implication de ce gène dans les rythmes circadiens. En effet, en libre cours, les souris présentant le phénotype

« *vacillans* » ont une période d'activité locomotrice plus longue que celle observée chez les souris sauvages (Andre et al., 1998a). Un lien entre ROR β et la mélatonine a été évoqué dans trois articles. Une première étude portant sur la glande pinéale montre un parallèle entre le rythme de synthèse de la mélatonine et le rythme d'expression de *ror β* (Becker-André et al., 1994 ; Wiesenberg et al., 1995). Puis, Becker-André et collaborateurs ont suggéré que la mélatonine puisse être le ligand endogène de ROR β avant de publier un erratum trois ans plus tard, ne pouvant reproduire leurs résultats (Becker-André et al., 1994). Enfin, une seconde isoforme de ROR β spécifiquement exprimée dans la pinéale et la rétine a été rapportée (André et al., 1998b). En effet, par un clonage par 5'RACE, 2 isoformes de *ror β* ont été identifiées l'une de 1.5kb et l'autre de 10kb. Elles sont issues du même gène mais les ARNm sont générés par un épissage alternatif en 5'. Les protéines ne diffèrent pas dans leur séquence de fixation à l'ADN mais par leur séquence N-terminale. Leur rôle respectif n'est cependant pas encore connu.

c. Le gène *ror γ*

Ce facteur de transcription de 63kD est présent uniquement au niveau périphérique et sous deux formes distinctes : la première ROR γ est présente dans le foie, les reins, les adipocytes et les muscles squelettiques (Hirose et al., 1994 ; Medvedev et al., 1996 ; Kurebayashi et Hirose, 1998) et l'autre forme, ROR γ_t ne se trouve que dans les thymocytes (Villey et al., 1999 ; Ortiz et al., 1995 ; Hey et al., 1998). *Ror γ* présente environ 50% d'homologie avec *ror α* et *ror β* , mais leurs séquences de fixation à l'ADN ont 89% d'homologie (Hirose et al., 1994). Enfin, la forme humaine possède 80% d'homologie avec la forme murine (Medvedev et al., 1996). Tout comme ROR α et ROR β , la protéine ROR γ active la transcription de gènes en se fixant sur la séquence RORE en monomère. ROR γ montre également une action activatrice sur l'expression de *bmal1* via la séquence RORE2 située sur son promoteur, dans les cultures de cellules HeLA et Cos-7 (Guillaumond et al., 2005 ; Sato et al., 2004b). Chez la souris, le rythme d'expression de *ror γ* mesuré par RPA est parallèle au rythme d'expression de *bmal1*, dans les muscles et les reins avec un maximum d'expression vers ZT 18. Enfin, *ror γ* est impliqué dans la différenciation adipocytaire dont la transcription est activée par la protéine PPAR γ (Kurebayashi et Hirose, 1998 ; Austin et al., 1998).

L'ensemble de ces récepteurs orphelins interagissent entre eux et avec d'autres gènes (les gènes horloges ou les PPAR) comme nous venons de le voir. Les PPAR sont une famille de gènes qui est particulièrement intéressante car ils régulent l'expression des gènes *rev-erb*. Mais surtout, certains de leurs membres agissent directement sur l'expression de *bmall*.

C. Les PPAR, le lien métabolique des gènes horloges

Les PPAR appartiennent à la famille des récepteurs orphelins comme les gènes *ror* et *rev-erb*. Ses membres, *ppara*, β/γ et δ , sont des récepteurs nucléaires activables par des lipides et contrôlant une grande variété de gènes dans les différentes cascades métaboliques des lipides dont le transport des acides gras, l'absorption cellulaire, la fixation intracellulaire, leur activation, ainsi que leur catabolisme ou leur stockage (Desvergne et Wahli, 1999). Pour agir, ils s'hétérodimérisent avec la protéine RXR α (Retinoid X receptor α) pour ensuite se fixer sur une séquence REV-DR2 spécifique appelée PPRE (Peroxisome proliferator-activated receptor response element, cf. tableau 1, Harding et Lazar, 1995 ; Hsu et al., 1998). Bien que les protéines ROR α , PPAR α et REV-ERB α soient très similaires et puissent ainsi se fixer sur des séquences PPREs, il n'y a cependant pas de généralisation possible, c'est à dire que les gènes possédant des PPREs ne sont pas tous sous le contrôle de ces trois protéines (Hsu et al., 1998 ; Kassam et al., 1999).

La protéine PPAR α est un récepteur des fibrates qui provoque la diminution des triglycérides et du HDL cholestérol circulant. Il a été découvert en 1990 grâce à sa capacité de stimulation de la prolifération peroxysomale (organelle impliqué dans l'oxydation des chaînes lipidiques des acides gras et le catabolisme du cholestérol (Vamecq et Draye, 1989). On le retrouve exprimé majoritairement dans le foie mais il est également présent dans le cœur, le rein, les muscles squelettiques et les tissus adipeux bruns (Braissant et al., 1996 ; Lemberger et al., 1996). Son site de fixation des ligands est très permissif comparé à d'autres récepteurs orphelins. Il est capable de fixer une grande diversité d'acides gras dont la longueur et la saturation de leurs chaînes sont très variables (Gottlicher et al., 1992 ; Banner et al., 1993). Une invalidation du gène *ppara* provoque une augmentation du niveau de cholestérol circulant et une obésité des souris âgées (Peters et al., 1997 ; Costet et al., 1998).

PPAR α présente une expression rythmique à la fois pour son niveau d'ARNm (avec un maximum d'expression vers ZT 8) et pour son niveau protéique dans les cellules hépatiques de rongeurs (Lemberger et al., 1996 ; Patel et al., 2001). PPAR α peut être régulé par des facteurs hormonaux tels que les glucocorticoïdes qui activent sa transcription, les taux d'acides gras circulants élevés (Steineger et al., 1994) ou l'insuline qui a un rôle inhibiteur sur la transcription de PPAR α et phosphoryle la protéine pour moduler son action (Lemberger et al., 1996 ; Juge-Aubry et al., 1999 ; Shalev et al., 1996 ; Zhang et al., 1996 ; Latruffe et al., 2000). Enfin, les ciprofibrates activent la protéine kinase C (PKC) par une protéine dépendante du calcium mais différente de la calmoduline (Passilly-Degrace et al., 2000). En retour, les dimères PPAR α /RXR α contrôlent l'expression des gènes *apoA1* et *apoCIII*, intervenant dans la régulation de la quantité de lipides circulants, pour diminuer les concentrations lipidiques sériques (Steineger et al., 1994, Desvergne et Wahli, 1999 ; et pour revue, Wahli et al., 1995). Ces résultats sont confirmés *in vivo* chez le rat ayant une invalidation pour le gène *ppar α* , qui présente des taux élevés d'ARNm de l'*apoCIII* dans le foie ainsi qu'une hypertriglycéridémie (Patel et al., 2001 ; Gibbons et al., 2002). L'invalidation du gène *ppar α* n'a cependant pas d'effets sur une autre fonction régulée par l'horloge principale, l'activité locomotrice (Canaple et al., 2006).

Les gènes horloges semblent avoir un rôle dans le métabolisme lipidique. En effet, des souris ayant une invalidation pour le gène *clock* ou *bmal1* ne présentent plus de variations cycliques des triglycérides circulants (Rudic et al., 2004 ; Turek et al., 2005). De plus, de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme des lipides, sont sur-exprimés ou à l'inverse sous-exprimés, dans le foie de ces souris (Panda et al., 2002a ; Oishi et al., 2003). De même, dans les adipocytes, BMAL1 stimule la synthèse des lipides (Shimba et al., 2005) et l'inactivation de *per1* dans une culture d'adipocytes, induit une désorganisation du métabolisme des lipides (Marquez et al., 2004). La délétion du gène *clock* provoque la perte du rythme de *ppar α* , *dbp*, *per2*, à la fois *in vivo* (foie) et *in vitro* (MCF cells) (Oishi et al., 2005). Ceci est dû à la présence de 2 *e-box* conservées (dont l'une est la cible prioritaire du dimère C/B) et de 4 *e-box* like (Oishi et al., 2005 ; Canaple et al., 2006).

PPAR α interagit avec les membres de la famille des bHLH-PAS (McNamara et al., 2001 ; Reppert et Weaver, 2001 ; Oishi et al., 2005). Enfin, RXR α interagit avec la protéine CLOCK, *via* leurs extrémités C-terminal (Cheng et al., 2004) et s'associe avec la protéine

PPAR α pour agir sur la séquence PPRE (Inoue et al., 2005 ; Nicolas-Frances et al., 2000). Des trimères RXR α /C/B peuvent se former, provoquant ainsi une diminution de la capacité d'activation du complexe C/B (McNamara et al., 2001). A l'inverse, les dimères PPAR α /RXR α et C/B pourraient agir en synergie sur la séquence REV-DR2 de certains gènes et ainsi augmenter leur transcription (Inoue et al., 2005).

PPAR δ , découvert en 1994 et exprimé préférentiellement dans les tissus adipeux, agit dans la différenciation adipocytaire (cf. § III.B.3.b, Kliewer et al., 1994). C'est également le récepteur du glitazone dans le diabète de type 2 (Sohda et al., 1982). Il agit au niveau des tissus adipeux dans l'utilisation du glucose et affecte la balance énergétique en inhibant l'expression d'une enzyme impliquée dans la gluconéogenèse. Le gène PPAR β/γ découvert en 1992, ayant une expression constitutive (Dreyer et al., 1992), est impliqué dans le syndrome métabolique (Luquet et al., 2004), l'activation des gènes de l'oxydation métabolique (Wolf, 2003), dans la cardiomyopathie (Cheng et al., 2004), le métabolisme du cholestérol (Fredenrich et Grimaldi, 2004), et l'obésité (Shin et al., 2004).

Ainsi, les gènes horloges permettraient de contrôler ou du moins de moduler le métabolisme des lipides *via* leur action sur *ppar α* . En retour, ce gène semble impliqué dans le contrôle des gènes horloges car chez les mutants *ppar α* , les expressions de *bmal1* et de *per3* non modifiées dans les NSC, ont une amplitude de leur oscillation affectée dans le foie. En résumé, le gène *ppar α* pourrait être une voie d'entrée de la régulation des boucles moléculaires dans le foie.

D. Les modifications post-transcriptionnelles

De nombreux contrôles post-traductionnels des protéines horloges faisant intervenir plusieurs protéines, notamment des protéines kinases, ont été évoquées dans le contrôle des protéines horloges. Comme les protéines horloges présentent des variations circadiennes de phosphorylation (Lee et al., 2001), l'étude du rôle de ces phosphorylations a pris une grande ampleur ces dernières années.

a. Les caséines kinases

La famille des caséines kinases I (CKI) présente 7 isoformes et appartient au groupe des protéines kinases à motif Sérine/Thréonine (Flotow et Roach, 1991 ; Gross et Anderson, 1998). Parmi ces isoformes, seules les CKI ϵ et CKI δ semblent jouer un rôle dans le contrôle circadien des protéines horloges (Vielhaber et al., 2000 ; Camacho et al., 2001). Les CKI ϵ et CKI δ sont exprimées dans les NSC, de façon constitutive (Lowrey et al., 2000 ; Lee et al., 2001 ; Ishida et al., 2001 ; Graves et Roach, 1995 ; Cegielska et al., 1998). Elles présentent néanmoins un rythme d'activité en fonction de leur état de phosphorylation. En effet, les CKI ϵ et CKI δ présentent plusieurs sites d'auto-phosphorylation dans leur partie C-terminal les rendant inactives (Gietzen et Virshup, 1999). Cependant, les protéines phosphatases 5, 2A et 2B (PP5, PP2A et PP2B (également appelée calcineurine)) viennent activer la CKI ϵ en s'associant à CRY2 (Partch et al., 2006 ; Gietzen et Virshup ; 1999 Cegielska et al., 1998). Pour PER1, la phosphorylation par la CKI ϵ n'aurait soit aucun effet sur la localisation cellulaire de PER1 (Lee et al., 2001) ou aurait pour effet d'empêcher son entrée dans le noyau en masquant son NLS (Vielhaber et al., 2000 ; Eide et al., 2002 ; Miyasaki et al., 2004) ou de faciliter son entrée. Des expériences menées dans des cellules de foie humain en culture, ont montré que si PER1 est co-transfecté avec CKI ϵ ou PER2, on observe une localisation uniquement cytoplasmique par une fixation de la CKI ϵ sur la séquence masquant le domaines NLS des protéines PER (Vielhaber et al., 2000 ; Akashi et al., 2002). Cependant pour ce dernier, Lee et ses collaborateurs ne rapportent qu'une interaction indirecte par l'intermédiaire de PER1 (Lee et al., 2001). Enfin, des souches mutantes ont également montrées l'existence d'une interdépendance dans le passage nucléaire de ces protéines (Bae et al., 2001 ; Lee et al., 2001). L'entrée nucléaire de PER, CRY et CKI ϵ se fait en même temps (Lee et al., 2001 ; Akashi et al., 2002). L'importance de la CKI ϵ dans la genèse des rythmes circadiens est d'ailleurs confirmée par l'étude des mutants *Tau*. En effet, la diminution de la période du rythme d'activité locomotrice de cette souche de hamsters dorés est due à la mutation de la CKI ϵ (Lowrey et al., 2000). Cependant, on peut observer une similitude dans les profils d'expression de protéines PER1 phosphorylées et non phosphorylées avec ceux observés chez les souris sauvages, ce qui a permis de suggérer l'existence d'une autre CKI impliquée (Lee et al., 2001). CKI δ , présentant la plus forte homologie avec la CKI ϵ parmi les membres des CKI, est également capable de fixer la protéine PER1 et de la retenir dans le cytoplasme par

phosphorylation. Ceci suggère un certain degré de redondance fonctionnel dans le mécanisme (Vielhaber et al., 2000 ; Gross et Anderson, 1998 ; Camacho et al., 2001).

La phosphorylation de la protéine PER1 par la CKI ϵ et CKI δ , à la fois *in vivo* et *in vitro*, engendre également une diminution de stabilité de la protéine (Keesler et al., 2000). En effet, la demi-vie de la protéine PER1 non phosphorylée est proche de 24 heures alors que sa forme phosphorylée n'est que de 12 heures (Keesler et al., 2000). Ceci serait dû à une augmentation du niveau d'ubiquitination des formes phosphorylées et ferait intervenir le complexe du protéasome et cette augmentation est retrouvée dans toutes les études (Keesler et al., 2000 ; Miyazaki et al., 2004 ; Akashi et al., 2002). L'association des protéines semble les protéger de la dégradation *via* le protéasome. En effet, malgré un niveau normal très important de protéines PER2, elle ne reste indétectable aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme chez des souris doubles-mutantes pour les gènes *cry1/cry2* (Shearman et al., 2000 ; Okamura et al., 1999). De même, des souris ayant une invalidation pour le gène *per2*, présentent un niveau très faible de protéine CRY1 (Bae et al., 2001). Dans le cas de la boucle positive, la CKI ϵ aurait pour conséquence d'augmenter l'activation de BMAL1 (Eide et al., 2002) et son action sur CLOCK reste encore incertaine (Lee et al., 2001 ; Eide et al., 2002).

La phosphorylation permet donc de déterminer la localisation cellulaire et la stabilité des protéines horloges. Cependant, les rôles respectifs de ces deux isoformes de la CKI ne sont pas encore élucidés

b. Les MAP kinases

Les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) interviennent dans les effets photiques sur *per1* et *per2* dans les NSC, *via* la phosphorylation de la protéine CREB régulant la transcription de ces gènes horloges (cf. § III.A.2, Nakaya et al., 2003 ; Obrietan et al., 1998). Les MAPK agissent également sur les protéines horloges. La forme active des MAPK est la forme phosphorylée MAPK-P qui présente un rythme nycthéméral dans les NSC (Sanada et al., 2002 ; Obrietan et al., 1998 ; Pizzio et al., 2003). Le rythme est différent selon la région observée mais on observe un maximum d'activation ZT 6 et ZT 10 et des valeurs minimales entre ZT 18 et ZT 24 sauf dans la région centrale des NSC (Obrietan et al., 1998 ; Nakaya et al., 2003). L'interaction entre BMAL1 et MAPK-P permet à la fois la translocation vers le noyau mais aussi des modifications de la structure tridimensionnelle de BMAL1 (Yang et al.,

1998). Cette interaction semble avoir pour conséquence une diminution de la transactivation de BMAL1 sur les *e-box* (Sanada et al., 2002) qui est fortement diminuée en fin de jour et pendant la nuit. Il est donc possible que les MAPK-P contrôlent temporellement l'activité de BMAL1, au moins en fin de jour/début de nuit. Les MAPK semblent également intervenir dans la boucle négative. En effet, la MAPK-P phosphoryle CRY1 et CRY2 diminuant leur capacité à inhiber C/B (Sanada et al., 2002). L'activité maximum de MAPK-P se situant entre ZT14 et ZT20, elle pourrait permettre de lever l'inhibition due à CRY1 et CRY2 (Obrietan et al., 1998 ; Lee et al., 2000 ; Nakaya et al., 2003). En résumé, les MAPK pourraient être responsables de la régulation de l'activité transcriptionnelle de C/B, soit directement (en agissant sur BMAL1), soit indirectement (en agissant sur CRY1 et CRY2).

c. Les autres protéines kinases

La PKGII présente une activité régulée par l'horloge avec un maximum d'activité en fin de nuit subjective (Tischkau et al., 2003a). L'application d' α ODN de la PKGII sur des tranches de NSC, provoque une variation de l'activité électrique spontanée des neurones des NSC (Tischkau et al., 2004). La PKGII peut interagir directement avec CLOCK permettant ainsi d'augmenter son degré de phosphorylation (Tischkau et al., 2004). Cependant, le rôle de cette phosphorylation de CLOCK par la PKGII n'est pas encore élucidé.

La GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) est présente dans les NSC et sous deux isoformes : GSK-3 α et GSK-3 β (Woodgett, 1990). Cependant, les rôles circadiens joués par les deux isoformes, semblent être différents. La GSK-3 α présente une oscillation nycthémérale avec un maximum d'expression vers ZT 5 chez la souris (Iwahana et al., 2004). Elle est inactivée par phosphorylation et activée par l'action de la PP2A (Sutherland et Cohen, 1994). Son effet moléculaire au sein de l'horloge n'a pas encore été identifié mais il semble qu'elle soit impliquée dans le contrôle de la période circadienne. En effet, l'ajout de lithium à la nourriture des souris, provoque une augmentation de la période circadienne de l'activité locomotrice. Ce traitement provoque également, une diminution de l'activité de la GSK-3 α mais uniquement dans les NSC (Iwahana et al., 2004). Ainsi, la GSK-3 α aurait un rôle actif dans la régulation de la période des rythmes endogènes. Quand à la GSK-3 β , elle est exprimée de façon constitutive et présente une régulation de son activité de façon journalière avec un pic à la transition jour/nuit subjective, donc peu avant le pic de CRY2 (Harada et al., 2005). Cette inactivation par phosphorylation semble être catalysée par plusieurs kinases dont

certaines induites par la voie des MAPK (Sturgill et al., 1988 ; Butcher et al., 2004), suggérant ainsi un contrôle de l'activité de la GSK-3 β par la voie des MAPK. La GSK-3 β présente la particularité de provoquer la formation de CRY2-(P)₂ qui serait très instable et rapidement dégradée par le complexe du protéasome.

IV. La mélatonine

A. Introduction

McCard et Allen furent les premiers à montrer en 1917 que des extraits de glande pinéale de bœuf provoquent un éclaircissement de la peau de la grenouille *Rana pipiens*. Comme ces extraits entraînaient une agrégation des granules de mélanine dans les mélanophores, ils nommèrent mélatonine le composé actif. Des préparations de mélanophores de grenouille ont ensuite été utilisées pour **1)** élucider la structure chimique de la mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) (Lerner, 1959), **2)** établir la relation entre la structure et l'activité des analogues de la mélatonine, **3)** évoquer l'hypothèse de l'existence de récepteurs de la mélatonine (Heward et Hadley, 1975) et **4)** démontrer une inhibition par la mélatonine de la formation de l'AMPc *via* des récepteurs couplés à une protéine G (White et al., 1987). La mélatonine est principalement produite par la glande pinéale ou épiphyse car une ablation de cette dernière ou pinéalectomie, rend la présence de mélatonine indétectable dans le plasma ce qui en fait la source majeure de mélatonine circulante. Il existe cependant d'autres sources de synthèse de cette hormone telles que la glande de Harder (Djeridane et al., 1998) et la rétine (Cardinali et al., 1974 ; Fujieda et al., 1999). Cependant au sein de ces tissus, la mélatonine n'aurait qu'un rôle autocrine et/ou paracrine (Savaskan et al., 2002).

B. La synthèse de la mélatonine et son métabolisme

Chez le rat, les concentrations plasmatiques de mélatonine présentent des variations circadiennes et saisonnières. Les valeurs de jour mesurées dans le plasma, sont comprises entre 10 et 20 pg/ml et les valeurs nocturnes comprises entre 80 et 150 pg/ml. Ce rythme de synthèse est endogène et persiste donc en conditions constantes du moment que l'intégrité des NSC est préservée (Klein et Moore, 1979) mais une exposition nocturne des animaux à la lumière entraîne une inhibition de sa synthèse/libération. La mélatonine possède une structure chimique qui lui confère une lipophilie importante. Il en résulte qu'elle n'est pas stockée dans

la glande pinéale mais est relarguée dès sa synthèse dans le flux sanguin. En effet, la mélatonine est catabolisée majoritairement par le foie et les reins où elle est hydroxylée en 6-hydroxy-mélatonine (Yu et al., 1993). Ce catabolisme rapide fait que la mélatonine a une demi-vie très courte de 20 à 30 minutes dans le sang (Mauviard et al., 1991).

La libération de mélatonine a lieu non seulement dans la circulation sanguine mais aussi dans le fluide céphalorachidien et chez le mouton, où les plus fortes concentrations de mélatonine y sont trouvées (Malpaux et al., 2001). Sa synthèse exclusivement nocturne et proportionnelle à la longueur de la nuit, en fait une hormone donneuse de temps (rat : Illnerova et Vanecek, 1980 ; mouton : Rollag et Niswender, 1976 ; Karsch et al., 1988). Elle fournit d'une part une information jour-nuit, codée par la présence ou l'absence de mélatonine dans la circulation sanguine et d'autre part une information saisonnière codée par la durée du pic de sécrétion nocturne de mélatonine qui varie avec les changements annuels de la photopériode (pour revues : Pévet, 1988 ; Ribelayga et al., 1999 ; Simonneaux et Ribelayga, 2003).

1. Synthèse

Le tryptophane (Trp) circulant est capturé par les pinéalocytes afin d'initier la biosynthèse de la mélatonine par la production de 5-hydroxy-tryptophane (5HTP) dont l'enzyme de synthèse est la tryptophane-hydroxylase mitochondriale (Wurtman et Anton-Tay, 1969) (cf. figure 9). Le 5HTP est ensuite transformé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques en 5-hydroxytryptamine (5HT ou sérotonine) synthétisée en permanence par la glande pinéale, mais principalement sécrétée de jour (Sun et al., 2003). La 5HT est ensuite convertie en N-acétylsérotinine (NAS) par l'arylalkylamine N-acétyltransférase (AA-NAT), l'enzyme limitante de la biosynthèse de la mélatonine (Klein et al., 1997). Enfin, la NAS est O-méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyle transférase (HIOMT) pour donner la mélatonine (Gauer et Craft, 1996), ayant une structure lipophile permettant le passage quasi instantané à travers la membrane de pinéalocytes, et qui est directement libérée dans la circulation après sa synthèse.

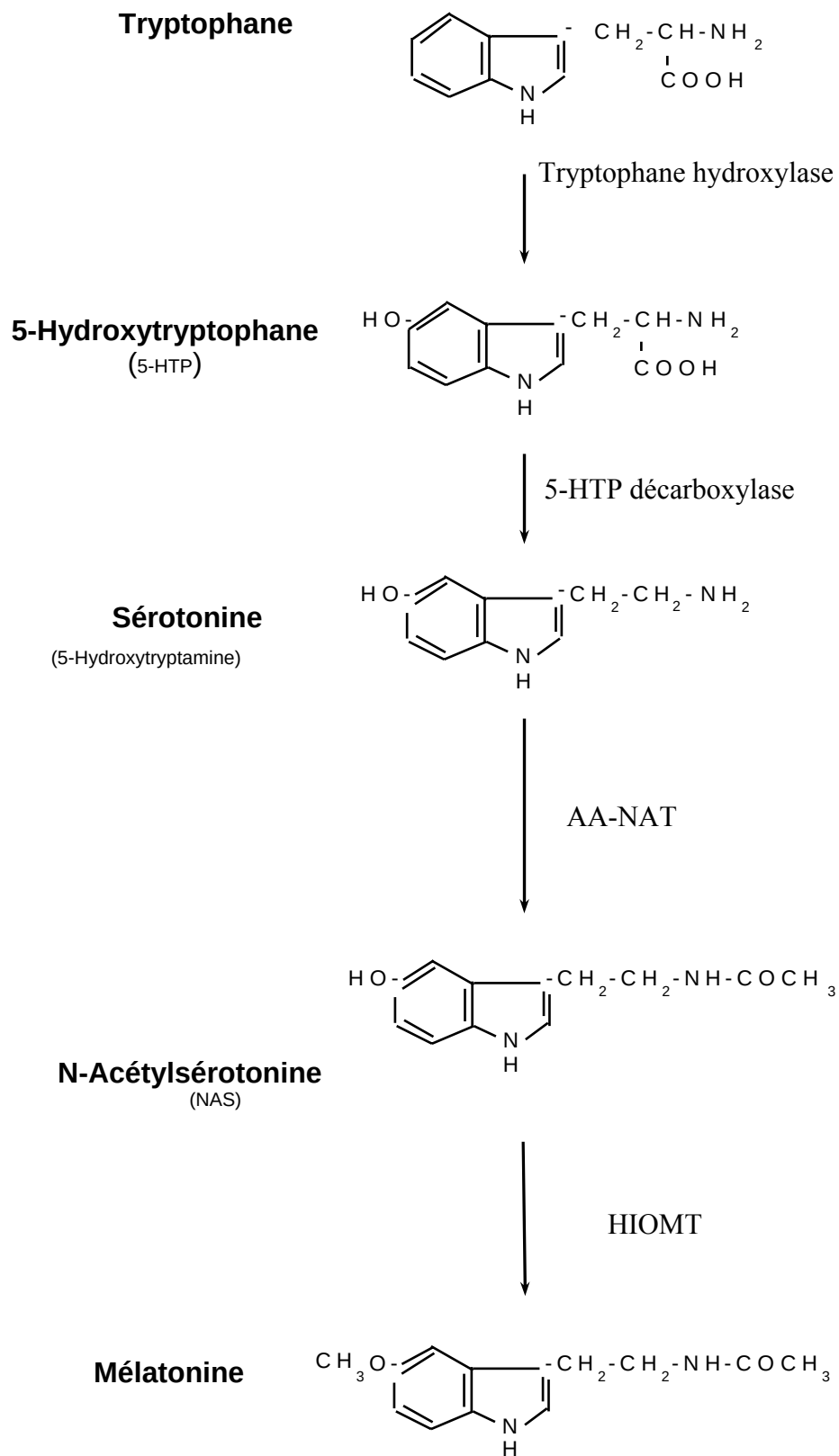


Figure 9 : Biosynthèse de la mélatonine

2. La régulation nerveuse de la synthèse de la mélatonine

La glande pinéale est innervée par des fibres nerveuses de diverses origines. Cependant, la voie majoritaire de contrôle de la glande pinéale consiste en une voie polysynaptique issue des NSC et se terminant par une innervation sympathique noradrénergique (cf. figure 10) (Moore et Klein, 1974 ; Klein et Moore, 1979 ; Moore, 1996 ; Larsen, 1999 ; Teclemariam-Mesbah et al., 1999 ; Perreau-Lenz et al., 2003). Chez les Mammifères, le rythme de synthèse de mélatonine est sous la dépendance directe des NSC avec une période proche de 24 heures en conditions constantes (Klein et Moore, 1979). L'horloge transmet l'information journalière vraisemblablement *via* des fibres GABAergiques aux PVN, premier relais de cette voie polyneurone (Kalsbeek et al., 1999). Ces neurones projettent ensuite vers les neurones préganglionnaires de la colonne intermédiolatérale (IML) de la moelle épinière au niveau thoracique. Enfin, les neurones de l'IML projettent cette information lumineuse nerveuse sur les neurones des ganglions cervicaux supérieurs (SCG) innervant la glande pinéale. Les neurones des SCG synthétisent de la noradrénaline (NA) qui n'est libérée que durant la nuit dans le parenchyme de la glande superficielle, activant alors la synthèse de mélatonine *via* des récepteurs de type β_1 et α_1 (Sugden et al., 1987 ; Ho et al., 1988 ; Schaad et al., 1995 ; Korf et al., 1996).

Bien que la NA joue un rôle indispensable pour la synthèse de mélatonine, d'autres molécules telles que l'Ach, le VIP, le NPY, l'AVP ou bien encore le PACAP, interviennent dans la régulation de la synthèse de la mélatonine suivant des modalités encore mal connues (Letz et al., 1997 ; Schaad et al., 1995 ; Schomerus et al., 1995 ; Simonneaux et al., 1994 et 1996 ; pour revue : Simonneaux et Ribelayga, 2003).

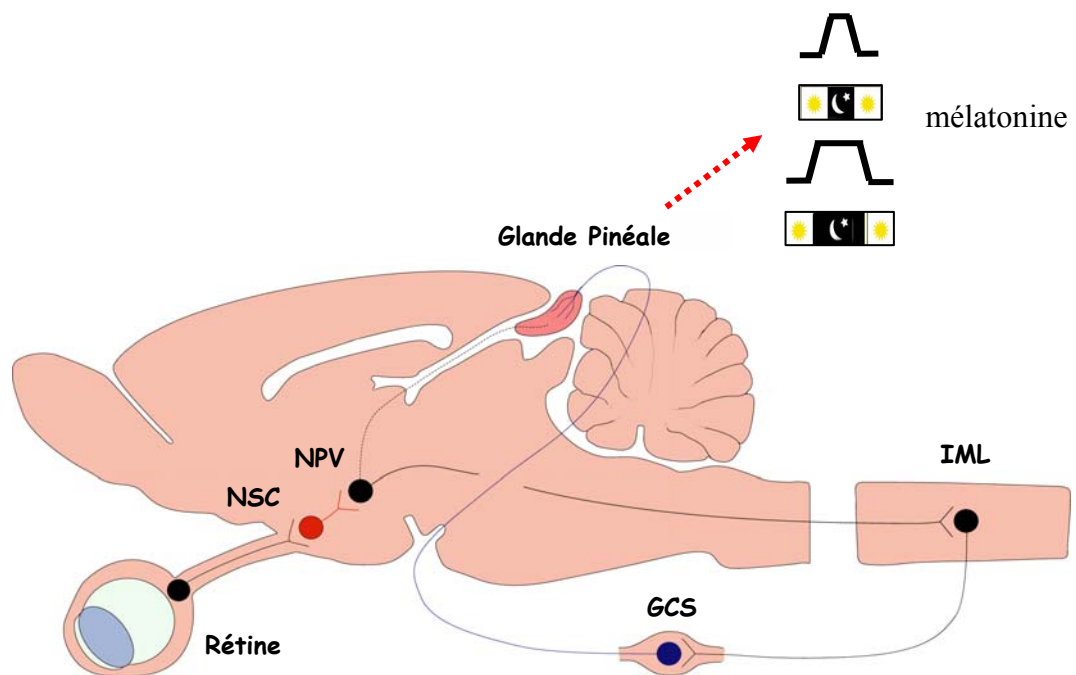


Figure 10: Représentation en coupe sagittale de la voie polyneurone de la rétine à la glande pinéale.

Chez les Mammifères, l'horloge principale localisée dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, est entraînée à 24 h par le cycle jour/nuit. Les NSC transmettent le signal circadien à d'autres structures cérébrales, et notamment à la glande pinéale qui traduit ce message nerveux en un message endocrine : la sécrétion nocturne de mélatonine. Sa synthèse exclusivement nocturne est proportionnelle à la longueur de la nuit. Les variations rythmiques de la concentration de mélatonine circulante véhiculent ainsi l'information jour/nuit, mais également une information saisonnière.

NSC : noyaux suprachiasmatiques

NPV : noyaux paraventriculaires

IML : colonne intermédiolatérale

GCS : ganglions cervicaux supérieurs.

3. La régulation moléculaire de la synthèse

Le rythme circadien de sécrétion de la mélatonine est directement dépendant du rythme de l'activité de l'AA-NAT. C'est donc l'enzyme limitante de la biosynthèse de la mélatonine (Klein et Weller, 1970). Toutefois, des variations de l'expression de l'HIOMT ont aussi été décrites chez le rat (Gauer et Craft, 1996). Cependant, de telles variations ne semblent pas avoir de conséquences à priori sur le rythme circadien de sécrétion de mélatonine à court terme, mais plutôt à long terme (Ribelayga et al., 1997). Le mécanisme de synthèse nocturne de NAS met en jeu l'activation noradrénergique par les récepteurs β_1 (cf. § IV.C.1), avec un profil de libération nocturne de la NA corrélé à celui de la sécrétion de la mélatonine (Drijfhout et al., 1996). Cette activation entraîne une cascade moléculaire empruntant la voie des récepteurs noradrénergiques à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G_s . Cette voie AMPc-PKA conduit par la suite, à une activation du gène de l'AA-NAT par phospho-CREB (P-CREB). Le facteur de transcription CREB se fixe ensuite sur le site CRE du promoteur de l'*aa-nat* pour permettre la transcription de ce gène (Roseboom et Klein, 1995 ; Baler et al., 1997). Parallèlement, l'augmentation du taux d'AMPc permet aussi une augmentation de l'activité de l'AA-NAT (voir Klein, 1985 pour revue). De plus, la NA potentialise les effets du récepteur β_1 , en agissant également sur les récepteurs α_1 , par des mécanismes multiples faisant intervenir la cascade de transduction caractéristique des récepteurs aux protéines G ainsi qu'un influx de Ca^{2+} via des canaux voltage-dépendants (Ribelayga et al., 1999 ; Stehle et al., 2001 ; Simonneaux et Ribelayga, 2003).

Chez les rongeurs, l'arrêt de la libération de NA, en fin de nuit engendre une diminution des taux d'AMPc dans les pinéaloctes et donc de la protection de l'AA-NAT par la PKA rendant possible sa dégradation par le protéosome (Klein et al., 1978 ; Drijfhout et al., 1996). En parallèle, P-CREB induit la transcription d'*Icer* (inductible cAMP early repressor) qui s'accumule pendant la nuit. La protéine ICER est fortement présente en fin de nuit et entre en compétition avec P-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 (pour revue Stehle et al., 2001 ; Simonneaux et Ribelayga, 2003). Enfin, la déphosphorylation de CREB résultant de l'arrêt de la libération de la NA va arrêter la néotranscription de l'*aa-nat* (Maronde et al., 1999).

4. Le métabolisme

La mélatonine est rapidement dégradée par le foie et les reins, elle est hydroxylée en 6-hydroxy-mélatonine qui est ensuite excrétée sous forme sulfatée ou glucuronée. La forme sulfatée : la 6-sulphatoxy-mélatonine mesurée dans l'urine, aussi bien chez l'homme que chez le 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 (Rajaratnam et Arendt, 2001).

C. Les récepteurs de la mélatonine

1. Introduction et généralités

Pour expliquer les effets biologiques de la mélatonine, Heward et collaborateurs en 1975 furent les premiers à évoquer l'existence de récepteurs. Pour expliquer les actions de la mélatonine dans différents tissus, à la fois nerveux et périphériques chez les Mammifères comme chez les autres Vertébrés (Heward et al., 1975).

L'étude de ces récepteurs a cependant pu réellement être développée après la mise au point de la synthèse de la 2-¹²⁵I-mélatonine (Vakkuri et al., 1984). Ce radioligand initialement développé pour les dosages radio-immunologique (RIA) fut employé avec succès en autoradiographie pour la première fois en 1987 (Vanecek et al., 1987). Il remplaça dès lors la mélatonine tritiée qui n'avait donné jusque là que des résultats peu reproductibles (pour revue, Kennaway et Hugel, 1992). Les premiers résultats ont rapidement permis de désigner deux structures cibles de ce message hormonal : les NSC et la *pars tuberalis* (PT) (Weaver et al., 1988 ; Vanecek et al., 1987 ; Reppert et al., 1988). Cependant des sites de fixation de la mélatonine ont été décrits dans l'ensemble du cerveau et le nombre de structures cérébrales marquées a considérablement augmenté depuis la fin des années 1980. On recense en effet actuellement, parmi toutes les espèces étudiées, plus d'une centaine de structures cérébrales présentant des sites de liaison spécifiques pour la 2-¹²⁵I-mélatonine (Masson-Pévet et al., 1994 ; Morgan et al., 1994 ; Williams et al., 1995).

D'une espèce à l'autre, le nombre et la nature des structures marquées varient considérablement. Cependant deux structures, les NSC et la PT, semblent présenter des marquages à la 2-¹²⁵I-mélatonine et donc potentiellement des récepteurs de la mélatonine chez

quasiment toutes les espèces étudiées. La PT est la structure dans laquelle la densité des sites de liaison pour la 2-¹²⁵I-mélatonine est la plus élevée (Vanecek et al., 1987 ; Weaver et al., 1989 ; Morgan et al., 1994, Masson-Pévet et al., 1994). Dans la PT et les NSC, la densité de marquage à la 2-¹²⁵I-mélatonine présente un rythme nycthéméral avec un maximum à la transition jour/nuit et une diminution rapide en début de nuit chez des rats placés en LD (Gauer et al., 1993 et 1994a). Ces variations circadiennes sont sous le contrôle exclusif de la mélatonine dans la PT alors que dans les NSC ce contrôle se fait conjointement par le glutamate qui véhicule l'information du cycle jour/nuit (Gauer et al., 1992, 1993a, 1993b, 1994a et 1994b; Guerrero et al., 2000 ; Masson-Pévet et al., 1996).

2. Les récepteurs de la mélatonine

Initialement, deux types de récepteurs de la mélatonine ont été pharmacologiquement décrits : le type ML1 avec une constante de dissociation (K_D) de l'ordre de 20 et 200 pM dit sites de haute affinité et ML2 avec un K_D nanomolaire décrit initialement sur des broyats de cerveau de hamster et dit sites de basse affinité (Dubocovich, 1988). La classification de ces deux types est basée sur la différence des propriétés pharmacocinétiques de la 2-¹²⁵I-mélatonine (pour revue : Dubocovich, 1995). A l'heure actuelle, le ML2 semble être une enzyme, la quinone réductase 2 (QR) (voir § IV.D.2.b) (Nosjean et al., 2000 et 2001 ; Duncan et al., 1988).

a. Les récepteurs de haute affinité

Actuellement, 3 sous-types de récepteurs à haute affinité ont été clonés et nommés *mel_{1c}*, MT₁ et MT₂. La nomenclature des récepteurs de la mélatonine suit les propositions de l'IUPHAR. Le récepteur MT₁ fut tout d'abord appelé *mel_{1a}* puis *mt₁*, alors que le récepteur MT₂ était précédemment connu sous le terme de *mel_{1b}*. Tous ces différents récepteurs clonés font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (cf. figure 11) mais avec des particularités qui justifient leur classement en une sous-famille spécifique de récepteurs couplés aux protéines G (pour revue générale : Pierce et al., 2002). La partie N-terminale dont la longueur est très variable, s'étend dans le milieu extracellulaire, alors que la séquence C-terminale est cytosolique. Les récepteurs de la mélatonine sont constitués de 346 à 420 acides aminés et leur masse molaire est comprise entre 39 et 47 kDa. Le motif NRY (Asn-Arg-Tyr) nécessaire à l'activation du récepteur, remplace la séquence DRY (Asp-Arg-

Tyr) habituellement présente dans la deuxième boucle cytosolique des récepteurs aux protéines G (Kokkola et al., 1998). Les boucles i2 et i3 (cf. figure 11) semblent être responsables en grande partie de la spécificité ainsi que de l'efficacité du couplage entre le récepteur membranaire et une protéine G (Kokkola et al., 1998). Un motif NAXXY remplace le motif NPXXY traditionnellement retrouvé dans le 7^{ème} domaine transmembranaire des récepteurs aux protéines G (Kokkola et Laitinen, 1998). Des travaux utilisant des récepteurs chimériques ont montré que la glycine en position 268 (au niveau du 6^{ème} domaine transmembranaire des récepteurs de la mélatonine) pourrait être un résidu critique pour la liaison du ligand et le fonctionnement adéquat du récepteur (Conway et al., 2000).

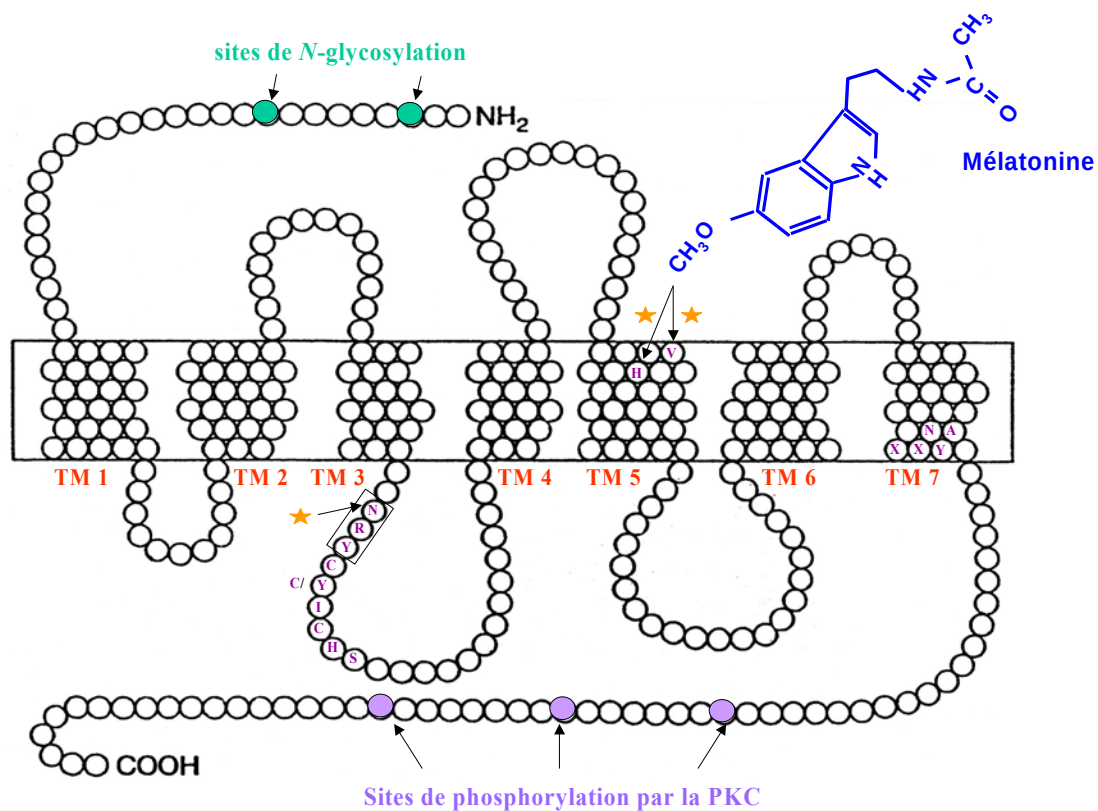


Figure 11 : Structure transmembranaire et caractéristiques générales des récepteurs de la mélatonine. Les acides aminés de certaines parties de la séquence mentionnée sur ce schéma, correspondent aux particularités de la séquence des récepteurs de la mélatonine.

A : alanine , C : cystéine, H : histidine, I : isoleucine, N : asparagine, R : arginine ,S : sérine
V : valine,Y: tyrosine ,TM1-7 : Domaines transmembranaires.

Des expériences de mutagenèse dirigée (★) ont permis d'identifier des acides aminés impliqués dans la liaison du ligand et dans la fonction du récepteur.

D'après Reppert et al., 1996.

➤ Le récepteur non mammalien : Mel_{lc}

C'est le tout premier récepteur de haute affinité qui fut identifié par le groupe de Reppert, par clonage par expression à partir de mélanophores (Ebisawa et al., 1994). Ce récepteur nommé mel_{lc} , présente des caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques comparables à celles des sous-types MT_1 et MT_2 . Toutefois, ce sous-type n'a pas été détecté chez les Mammifères (Reppert, 1997). Comme le MT_1 et le MT_2 , le récepteur mel_{lc} semble moduler la voie du guanosine 3'5'-cyclique monophosphate (GMPc) intracellulaire *via* une protéine G (Jockers et al., 1997).

➤ MT_1 (mel_{la})

Le gène mt_1 code pour une protéine de 420 acides aminés ayant une haute affinité pour la 2-¹²⁵I-mélatonine avec sept domaines transmembranaires (cf. figure 11). Le clonage de mt_1 chez les Mammifères (Homme et mouton) a été réalisé ainsi que la localisation chromosomique (Homme et souris) des récepteurs de la mélatonine (Reppert et al., 1994 ; Slaugenhaupt et al., 1995). Ce sont des récepteurs couplés à des protéines G de type inhibiteur (G_i ou G_q), présentent peu d'homologie entre eux (revue Dubocovich, 1995). Cependant, ces récepteurs montrent plusieurs sites consensus de phosphorylation par la PKC, qui participent à la fonction régulatrice de ces récepteurs. (Reppert et al. 1994, Ebisawa et al, 1994). Le gène mt_1 est très fortement exprimé dans deux structures : les NSC (Weaver et Reppert, 1996) et la PT, de toutes les espèces étudiées (Gauer et al., 1998 ; Poirel et al., 2002 et 2003a). Par RT-PCR, il a également été détecté dans d'autres parties du cerveau telles que la glande pinéale ou le cervelet (Poirel et al., 2002 ; Aust et al., 2004 ; Chucharoen et al., 2003 ; Fujieda et al., 1999 ; Peschke et al., 2000 ; Ting et al., 1999 ; Sallinen et al., 2005). L'ARNm du gène mt_1 est également exprimé de façon journalière, dans les NSC, avec deux maxima d'expression en début de nuit et milieu de jour (Poirel et al., 2002 ; Sallinen et al., 2005). Enfin, différentes formes alléliques de ce gène notées $mt_{1(\alpha)}$ et $mt_{1(\beta)}$ ont été identifiées dans la PT du mouton (Barrett et al., 1997 ; Pelletier et al., 2000). Le récepteur MT_1 est exprimé dans les NSC et la PT de la souris où l'on observe un marquage à la 2-¹²⁵I-mélatonine (Liu et al., 1997 ; Reppert et al., 1994 ; Weaver et al., 1996 ; Roca et al., 1996). Après invalidation de ce gène mt_1 , les sites de la liaison de la 2-¹²⁵I-mélatonine disparaissent dans ces deux structures. Ainsi, l'expression de ce sous-type semble être à la base des sites de liaison exprimés dans ces structures (Poirel et al., 2002).

Dans les NSC, ce récepteur serait impliqué dans l'inhibition partielle de l'activité électrique des NSC, puisqu'une invalidation du gène *mt₁* chez des souris, abolit l'action inhibitrice de la mélatonine sur l'activité électrique spontanée des cellules de tranches de NSC mais pas les décalages de phase (Liu et al., 1997). Chez ces souris mutées une injection de mélatonine en fin de jour subjectif, n'induit plus d'avance de phase du rythme d'activité locomotrice (cf. § IV.E.4). Dans la PT, il serait un relais de l'information photopériodique convoyée par la mélatonine (cf. § IV.E.1). Le récepteur MT₁ est également exprimé dans de nombreuses autres structures nerveuses telles que les PVT et dans une grande variété de tissus périphériques, avec des variations interspécifiques importantes.

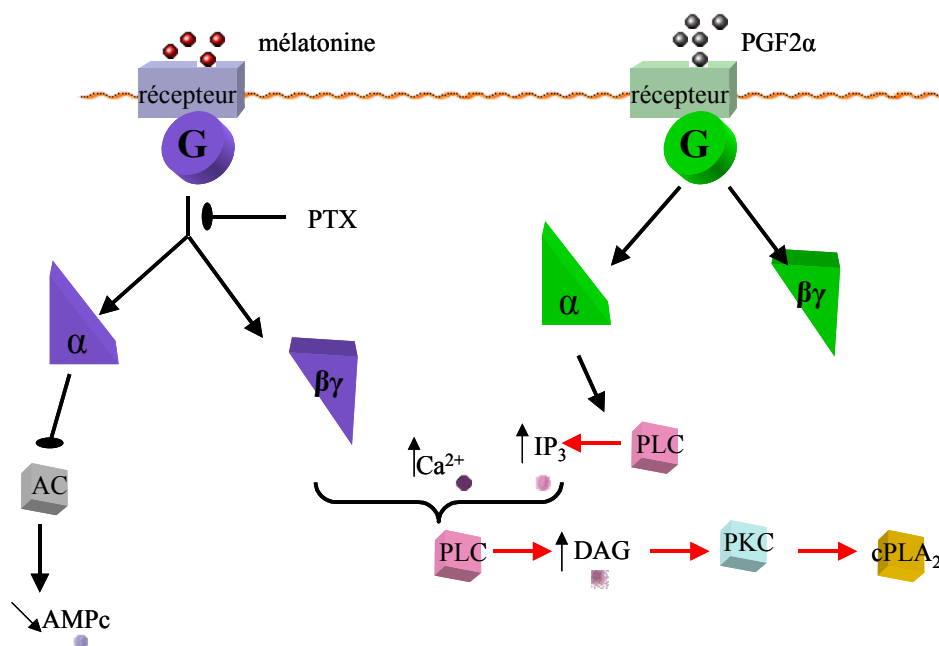


Figure 12 : Les différentes voies de transduction des récepteurs métabotropiques dont les récepteurs de la mélatonine.

Les récepteurs mélatoninergiques couplés à des protéines G, induisent une augmentation de Ca²⁺ via ses sous-unités βγ ainsi qu'une activation de la phospholipase C (PLC) activant la protéine kinase C (PKC). La sous-unité α de la protéine G, est une sous unité α_i qui inhibe la voie de l'adénylate cyclase (AC) et induit une diminution du niveau d'AMPc intracellulaire.

Comme tous les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, les récepteurs mélatoninergique mobilisent plusieurs cascades de transduction différentes qui vont être abordées successivement. La transduction du message véhiculé par la mélatonine, *via* le récepteur MT₁, utilise deux voies principales de transduction en inhibant la production d'AMPc induite par la forskoline (Godson et Reppert, 1997), et en activant la protéine kinase A (PKA) (Hazlerigg et al., 1994 ; McNulty et al., 1994 ; Morgan et al., 1991 ; Witt-Enderby et al., 1998). Le récepteur MT₁ peut également être couplé à une protéine G₀ qui se sépare en deux sous-unités : la première est la sous-unité α inhibant l'adenylate cyclase (AC), la seconde est composée des sous-unités β et γ de la protéine G, qui activent la PLC et provoquent l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (P_iP₂), l'accumulation d'inositol tri-phosphate (IP₃) et d'acide arachidonique (AA) (cf. figure 12) (Brydon et al., 1999 ; Godson et Reppert, 1997).

Action sur le niveau d'AMPc : L'AMPc est produit à partir d'adénosine triphosphate (ATP) par l'AC et peut être dégradée par une phosphodiesterase (PDE). L'AC est généralement activée ou réprimée en réponse à l'activation par un ligand (hormone, neurotransmetteur) d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G. L'AMPc fait partie des seconds messagers et participe en particulier à l'effet de la lumière sur les mélanophores de la grenouille (Abe et al., 1969 ; White et al., 1987). Dans des cultures de mélanophores, la mélatonine s'oppose à l'accumulation du niveau d'AMPc induite par des inhibiteurs de la PDE ou par des activateurs de l'AC tels que la forskoline (Abe et al., 1969 ; White et al., 1987 ; Daniolos et al., 1990 ; Van de Veerdonk et Konlin, 1970). Cet effet n'est pas dû à une activation de la voie de la PDE ou à une augmentation du catabolisme de l'AMPc (Morgan et al., 1991 ; Vanecek et Vollrath, 1989). L'action inhibitrice de la mélatonine sur l'accumulation d'AMPc par la forskoline, n'est pas restreinte aux mélanophores. En effet, elle se retrouve dans d'autres tissus et d'autres espèces telle que dans la PT de nombreux Mammifères (Morgan et al., 1989 ; Vanecek et Vollrath, 1989) ou dans l'épithélium pigmentaire de la rétine de rat (Iuvone et Gan, 1994 et 1995). Elle serait dirigée par une protéine G_i sensible à la toxine pertussique (PTX) reliée à l'AC. (Morgan et al., 1989). Enfin, un pré-traitement à la mélatonine des cellules de PT pendant 8h, suivi d'une fenêtre de repos, induit une sensibilisation de la réponse à la forskoline n'impliquant pas l'AMPc (Witt-Enderby et al., 1998).

Le récepteur MT₁ semble être constitutivement actif, mais la mélatonine en s'y fixant provoquerait une stabilisation du complexe récepteur aux protéines G (Roka et al., 1999 ; Van den Top et al., 2001). Cependant, dans la PT de mouton, la PTX n'a qu'un effet partiel sur l'inhibition de l'action de la forskoline sur l'AMPc et ceci même pour des concentrations importantes de l'inhibiteur (Morgan et al., 1990). Une pré-incubation avec la toxine cholérique est capable de bloquer l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'action de la forskoline et diminue également de moitié le nombre de sites de marquage de la 2-I¹²⁵-mélatonine dans la PT. Cette observation suggère l'association de plusieurs types de protéines G avec les récepteurs de la mélatonine (Morgan et al., 1990). La mélatonine pourrait également réguler la synthèse d'AMPc par un couplage avec le Ca²⁺. En effet, la plupart des AC sont sensibles aux variations de Ca²⁺_i. Cependant cette variation du Ca²⁺_i n'est pas l'effecteur primaire dans l'action de la mélatonine sur l'AMPc. En effet, dans un milieu sans sodium, la mélatonine n'a pas d'effet sur la concentration de Ca²⁺_i mais conserve son pouvoir d'inhibition sur l'AMPc, alors que dans un milieu sans calcium l'accumulation d'AMPc induite par la forskoline seule, est plus faible (McNulty et al., 1995 ; Vanecek, 1995).

Action sur le niveau de GMPc : La GMPc est produite à partir de la guanosine triphosphate (GTP) par la guanylate cyclase (GC) et peut être dégradée par une PDE. Comme l'AC, la GC est activée ou réprimée en réponse à l'activation par un ligand (hormone, neurotransmetteur) d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G. Dans des cultures néonatales d'hypophyse de rat, la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), hormone responsable de la libération des hormones sexuelles, provoque une augmentation de la concentration de GMPc. La mélatonine qui inhibe la libération de ces hormones sexuelles, est également capable d'inhiber l'augmentation de GMPc (Vanecek et Vollrath, 1989). L'action de la mélatonine est dose dépendante avec un maximum d'inhibition atteint à 10 nM. Le mécanisme d'action de la mélatonine n'est pas connu, mais la membrane des cellules hypophysaires de rats nouveau nés tout comme les GC solubles, sont sensibles au Ca²⁺_i. Une diminution de la concentration du Ca²⁺_i pourrait expliquer cet effet (Gorczyca et al., 1995, Laura et al., 1996 ; Wong et Garbers, 1992, voir § suivant). En revanche, des effets stimulateurs sur la concentration en GMPc ont été décrits dans d'autres tissus. Dans des cultures d'explants d'hypothalamus mis en présence d'inhibiteur de PDE, la mélatonine provoque une augmentation du niveau de GMPc (Vacas et al., 1981). La mélatonine potentialise aussi les effets induits par le VIP sur l'accumulation du GMPc dans les

lymphocytes humains (Lopez Gonzalez et al., 1992). Le rôle du GMPc dans la transduction des effets mélatoninergiques reste obscure.

Couplage avec le Ca^{2+}_i : La mélatonine inhibe l'augmentation du Ca^{2+}_i induite par le GnRH dans les cellules gonadotropes de rats nouveau nés (Vanecek et Klein, 1992 et 1993). Bien que la mélatonine n'ait pas d'effet sur les niveaux de base de Ca^{2+}_i , elle agit par une inhibition ponctuelle de l'influx initial de Ca^{2+}_i induite par la GnRH puis sur la mobilisation du Ca^{2+}_i et ceci de façon dose dépendante (Vanecek et Klein 1992 et 1993). Les effets de la mélatonine sur la concentration de Ca^{2+}_i ont été étudiés à l'aide de marqueurs fluorescents dans des cellules en suspension ou des cultures mono-couches (Kao et al., 1989 ; Vanecek et Klein 1992 et 1993). Les effets de la mélatonine se font *via* des protéines G_i/G_o mais toutes les cellules gonadotropes ne sont pas sensibles à la mélatonine (Vanecek et Klein, 1993). Il est établi que le calcium joue également un rôle central dans la libération de l'hormone luteïnisante (LH) (Chang et al., 1986 ; Clapper et Conn, 1985 ; Huckle et Conn, 1987 ; Izumi et al., 1989 ; Limor et al., 1987 ; Stojilkovic et al. 1989). Ce rôle central du Ca^{2+}_i dans la libération du LH et l'action de la mélatonine sur les concentrations de Ca^{2+}_i pourrait expliquer l'effet inhibiteur de la mélatonine sur la libération de la LH.

Action sur les phospholipides et leurs enzymes : Dans les NSC, la mélatonine induit une augmentation de l'activité de la PKC par son action sur la PLC (McArthur et al., 1997). Cette action sur la PKC pourrait être responsable du déphasage induit par la mélatonine. La mélatonine peut également affecter les seconds messagers dérivés des phospholipides membranaires. Elle est capable d'atténuer la libération d'AA dans des cultures d'hypophyses de rats nouveau nés (Vanecek et Vollrath, 1989). Dans les cellules gonadotropes, le GnRH agissant *via* la PLC, stimule la formation de diacide glycérol (DAG) et d' IP_3 issus du P_iP_2 (Andrews et Conn, 1986 ; Huckle et Conn, 1987 et 1988 ; Zheng et al., 1994). De plus, le GnRH stimule la production de l'AA *via* probablement la PLA_2 et la DAG lipase. En revanche, la mélatonine potentialise l'accumulation d' IP_3 induite par les $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans des NIH3T3 exprimant MT_1 , et ceci par une action sur la PLC responsable de l'hydrolyse du P_iP_2 (Godson et Reppert, 1997).

➤ MT₂ (*mel_{1b}*)

Le récepteur *mel_{1b}* a été renommé MT₂ suivant la proposition de l'IUPHAR. Ce récepteur a été cloné à partir d'une banque d'ADNc humaine (Reppert et al., 1995 ; Weaver et Reppert, 1996). Le récepteur MT₂ humain présente 60% d'homologie avec le récepteur MT₁ humain et possède des caractéristiques de liaison à la mélatonine et ses analogues, similaires à celles rapportées pour le MT₁. Tout comme le MT₁, ce récepteur est couplé à une protéine G inhibitrice de type G_i. Alors que l'activation de MT₁ entraîne une diminution des taux d'AMPc, l'activation du MT₂ entraîne une diminution du taux de GMPc (Brydon et al., 2001 ; Petit et al., 1999).

Des antagonistes spécifiques du sous-type MT₂ mis au point sur des modèles de cellules transfectées, inhibent les avances de phase normalement observées après une injection de mélatonine à CT 10 (Dubocovich et al., 1998). Comme l'effet inhibiteur de la mélatonine passe par l'activation des MT₁ et que les MT₂ semblent impliqués dans les avances de phases induites par l'hormone, il semblerait que le rétrocontrôle de la mélatonine sur l'activité circadienne des NSC implique à la fois les récepteurs MT₁ et MT₂.

Cependant, ces résultats se heurtent à deux observations majeures : **1)** Après invalidation du gène *mt₁*, les sites de liaison de la 2-¹²⁵I-mélatonine disparaissent totalement des NSC (Liu et al., 1997). Les récepteurs MT₂ ne sont détectables par autoradiographie que quand ils sont exprimés dans des cellules transfectées et présentent dans ce cas, des caractéristiques pharmacologiques très semblables à celles des MT₁ (Reppert et al., 1995). De plus, les antagonistes spécifiques MT₂ ne déplacent pas la liaison de la 2-¹²⁵I-mélatonine sur des coupes de NSC, alors qu'ils le peuvent sur ces cellules transfectées avec le gène *mt₂*, utilisé pour déterminer les caractéristiques pharmacologiques de ces composés (Dubocovich et al., 1998). L'hypothèse évoquée serait que le niveau d'expression des récepteurs MT₂ exprimés (*in vivo*) dans les NSC, est tel qu'ils ne sont pas détectables par autoradiographie. **2)** Des NSC de hamster sibérien en culture présentent une avance de phase du cycle circadien de leur activité neuronale par ajout de mélatonine (Weaver et al., 1996). Il a cependant été démontré que le récepteur MT₂ est non fonctionnel chez cette espèce (Weaver et al., 1996) et ne peut donc être le sous-type impliqué. Il faut donc en conclure que les effets de la mélatonine sur les NSC, observés chez ces rongeurs impliquent, le récepteur MT₁ uniquement.

b. Les sites MT₃ : la quinone réductase 2

Des sites de basse affinité ML2 avec une constante de dissociation proche du nanomolaire, ont été observés dans le cerveau du hamster (Dubocovich et al., 1988). Ces sites de liaison correspondraient non pas à un récepteur mais à une enzyme de détoxification antioxydante, la QR₂. Cette protéine de 26 kD présente une constante de dissociation très rapide : 0.3 s⁻¹. La forme humaine présente une homologie de 95% avec la séquence de l'enzyme chez le hamster. Des sites de fixation ont été observés avec un inhibiteur de la QR₂ marqué à l'iode: I¹²⁵-5-methoxy-carbonylamono-N-acetyl-tryptamine (I¹²⁵-MCA-NAT) dans les reins, le foie et le cerveau de hamster (Dubocovich, 1995 ; Duncan et al., 1988 ; Molinari et al., 1996 ; Paul et al., 1999 ; Nosjean et al., 2000 et 2001). Une étude conjointe du marquage de la I¹²⁵-MCA-NAT et de l'activité QR₂, montre une bonne corrélation entre les sites marqués et les niveaux d'activité enzymatique (Liao et al., 1962 ; Jaiswal, 1991, Zhao et al., 1997). Il existe cependant des différences d'intensité notamment dans le muscle squelettique où l'activité enzymatique est maximale pour un marquage MT₃ quasiment nul (Nosjean et al., 2001). A l'heure actuelle, les sites de basse affinité sont encore très mal connus et il est possible qu'ils n'existent que d'un point de vue strictement pharmacologique et non physiologique (Nosjean et al., 2001 ; Maillet et al., 2005).

c. Le GPR 50

Le GPR50 ou H9 a été cloné à partir de tissus hypophysaires humains (Reppert et al., 1996) et de mouton (Drew et al., 1998). La séquence protéique de ce récepteur présente 45% d'homologie avec celle des récepteurs connus de la mélatonine. La protéine identifiée est fortement exprimée dans la PT ainsi que dans de nombreuses régions de l'hypothalamus, à l'exception des NSC (Drew et al., 1998 et 2001). Ce récepteur ne lie pas la 2-¹²⁵I-mélatonine ou la mélatonine tritiée et n'est donc pas un récepteur de la mélatonine, mais aucun ligand endogène n'a encore été trouvé (Drew et al., 1998 ; Conway et al., 2000 ; Gubitze et Reppert, 1999). Le GPR50 forme des homodimères et hétérodimères avec les récepteurs MT₁ et MT₂. Cette association rend les récepteurs MT₁ et MT₂ incapables de fixer la mélatonine et elle diminue de moitié la réponse MT₁ à l'hormone (Levoye et al., 2006). Le GPR50 semble également impliqué *via* sa partie C terminale, dans l'internalisation de ces récepteurs sans l'être lui-même (Levoye et al., 2006). Enfin, ces récepteurs sont impliqués dans les troubles bipolaires et les dépressions majeures et certains autres membres des GPR sont liés à de hauts

niveaux de triglycérides et à des niveaux bas de HDL cholestérol (Thomson et al., 2005 ; Bhattacharyya et al., 2006).

D. Les effets de la mélatonine

1. Le rôle saisonnier de la mélatonine

L'effet le mieux connu de la mélatonine et l'un des plus étudiés, est son rôle dans la synchronisation des fonctions saisonnières. Dans nos régions tempérées, les espèces animales sont soumises à des variations des paramètres physiques de leur environnement en fonction des saisons. De nombreux Mammifères répondent à ces variations saisonnières par des modifications de certaines de leurs fonctions physiologiques et comportementales telles que la reproduction, l'hibernation, les changements de poids corporel ou de couleur du pelage, etc... Ces fonctions saisonnières sont synchronisées avec le temps astronomique, par l'intégration de la photopériode qui est chez les Mammifères, le facteur environnemental le plus important (Karsh et al., 1984). C'est ainsi qu'en fonction des saisons, le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) maintenu en conditions naturelles, présente des variations de son activité sexuelle se traduisant par une modification de la taille des testicules. Concernant les rythmes de reproduction chez les animaux photopériodiques, on distingue, en fonction de la durée du développement embryonnaire, les animaux de jours longs dont la durée de gestation est courte et les animaux de jours courts dont la durée de développement embryonnaire est longue ; ce qui permet d'avoir dans tous les cas un maximum de naissances au printemps. La diminution de la durée de la photopériode à partir d'un certain seuil, aura comme effet de rendre les animaux sexuellement inactifs en quelques semaines. Ce seuil a permis de définir, chez les animaux de jours long, la "photopériode critique" en dessous de laquelle les animaux photopériodiques sont sexuellement inactifs et au-dessus de laquelle ils sont actifs. Le mouton, animal de "jours courts" présente également une sensibilité à la photopériode en terme d'activité sexuelle. Mais, dans ce cas, pour des photopériodes supérieures à sa photopériode critique, le mouton devient inactif sexuellement.

Chez le hamster doré, la photopériode critique est de 12H30 de jour et une photopériode inférieure à cette longueur du jour est considéré par l'animal comme une photopériode courte (SP), et induit une régression testiculaire en 8 semaines. Une reprise spontanée de l'activité sexuelle se produit indépendamment de la photopériode après environ

24 semaines (Hoffmann, 1973 et 1979 ; Lerchl et Schlatt, 1993 ; Pévet, 1988a). Cette reprise spontanée correspond à la période photoréfractaire. L'animal ne sera alors de nouveau sensible à l'effet inhibiteur d'une nouvelle photopériode courte qu'après avoir auparavant, été soumis à un régime de photopériode longue (LP) pendant plusieurs semaines. Cette reprise spontanée de l'activité sexuelle permet aux animaux d'être sexuellement actifs dès le début de printemps, maximisant ainsi la durée de période de reproduction. En 1964, Czyba et ses collaborateurs, puis Hoffman et Reiter en 1965 (Czyba et al., 1964 ; Hoffman et Reiter, 1965) ont montré que chez des hamsters dorés maintenus en SP, la pinéalectomie prévenait la régression testiculaire, démontrant ainsi que la glande pinéale est indispensable à l'intégration de l'information photopériodique. En 1979, Goldman et ses collaborateurs ont effectué chez le hamster doré des injections de mélatonine en fin de jour, allongeant ainsi la durée de présence de la mélatonine dans le plasma, et ils ont pu induire une régression testiculaire, quelles que soient les conditions photopériodiques (Goldman et al., 1979). Enfin en 1983, Bittman et ses collaborateurs ont réalisé, chez des brebis pinéalectomisées placées en SP, des infusions nocturnes de mélatonine mimant le profil de la sécrétion de mélatonine normalement observé chez des animaux placés en LP, qui ont entraîné une réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique de type LP, et inversement (Bittman et al., 1983).

Ainsi, l'implication de la mélatonine dans la synchronisation des fonctions saisonnières, et en particulier celle de la reproduction, a donc été clairement établie chez de nombreuses espèces photopériodiques, par des approches telles que la pinéalectomie ou des injections de mélatonine, de durée variable (pour revues : Reiter, 1980 ; Pévet, 1988b ; Goldman et Darrow, 1983 ; Karsh et al., 1984 ; Tamarkin et al., 1985). La mélatonine constitue donc le relais endocrine permettant aux fonctions saisonnières d'intégrer les variations photopériodiques et donc de se synchroniser avec les variations annuelles de l'environnement.

La réponse saisonnière à la photopériode implique plusieurs structures cérébrales. En effet, une lésion des noyaux dorso-médians de l'hypothalamus chez le hamster syrien placé en LP, et qui reçoit une infusion quotidienne de mélatonine de type SP, provoque la perte de la réponse de l'axe reproducteur mais pas celle du rythme de sécrétion de la prolactine (PRL, cf. § IV.E.2.b) qui devient alors de type SP (Maywood et Hastings, 1995). Depuis 1989, grâce au très grand nombre de récepteur de la mélatonine exprimé, la PT constitue la cible privilégiée dans l'étude des structures impliquées dans le message saisonnier de la

mélatonine. Cependant en 1993, Malpaux et ses collaborateurs ont montré que l'aire medio-basale de l'hypothalamus est en fait le site d'action de la mélatonine dans le contrôle saisonnier de l'axe reproducteur chez le mouton. C'est ainsi que chez le mouton, des implants de mélatonine dans l'hypothalamus médio-basal ont un effet sur l'activité sexuelle mais pas sur la sécrétion de la PRL, alors que les implants situés à proximité de la PT ont un effet sur cette dernière mais reste sans effet sur l'activité sexuelle (Malpaux et al., 1993). Une seconde étude a permis de montrer que l'aire prémammillaire de l'hypothalamus intervient comme médiateur dans cet effet de la mélatonine sur l'état d'activité sexuelle (Malpaux et al., 1998). Ainsi, le contrôle de l'activité sexuelle par la mélatonine fait intervenir des cibles hypothalamiques autant chez les rongeurs que chez le mouton, mais des sites différents (pour revues, Malpaux et al., 2001). Cependant la PT, la structure la plus marquée par la I¹²⁵-mélatonine, est impliquée dans le contrôle mélatoninergique de la sécrétion saisonnière de la PRL, elle-même impliquée dans les changements saisonniers de nombreuses fonctions physiologiques (cf. § IV.E.2.b). La PT conserve donc un intérêt particulier dans l'étude des voies de signalisation moléculaire du message mélatoninergique.

2. La pars tuberalis

a. Anatomie et localisation

Chez les Vertébrés, la PT est une partie clairement définie et morphologiquement distincte de l'adénohypophyse (cf. figure 13) (Gross, 1984). Elle constitue un tissu endocrine glandulaire d'épaisseur variable suivant l'espèce (très mince, 2-4 couches cellulaires, chez les rongeurs, elle a jusqu'à 75 couches chez le mouton) (Gross, 1984). S'étendant de l'éminence médiane à la tige pituitaire, elle est formée rostralement de deux groupes latéraux de cellules se réunissant en un seul feuillet qui borde et entoure la tige pituitaire. Elle est séparée de la *Pars distalis* (PD) de l'adénohypophyse par un tissu conjonctif au travers duquel les vaisseaux afférents du plexus primaire du système porte hypothalamo-hypophysaire, pénètrent dans la PT fortement vascularisée (pour revues, Stoeckel et al., 1979 ; Burrows et al., 1999).

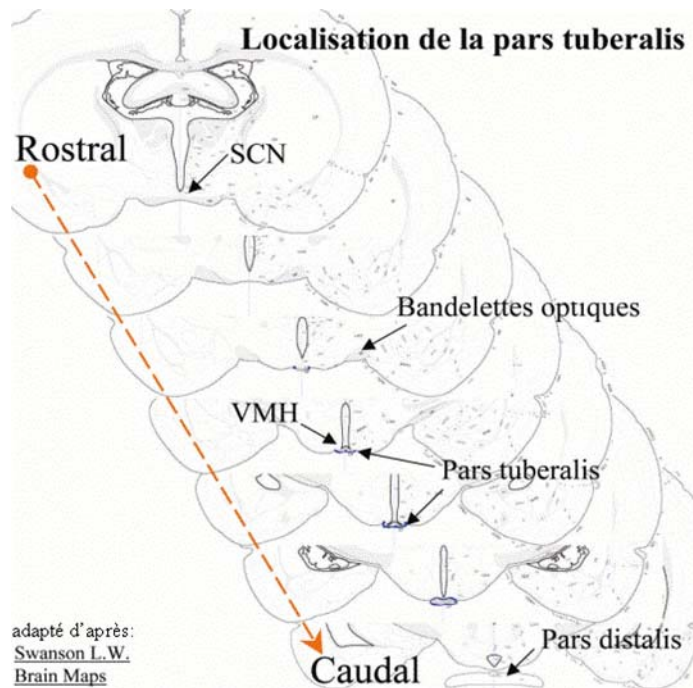


Figure 13 : Localisation anatomique de la pars tuberalis suivant l'axe rostro-caudal chez le rat. Cette structure n'est constituée que de quelques couches de cellules superposées et sa forme varie beaucoup suivant l'axe rostro-caudal. VMH : hypothalamus ventro-médian

La PT est composée de trois types de cellules : des cellules spécifiques de la PT, des cellules folliculo-stellaires et des cellules de même type que les gonadotrobes de la PD. (Rudolf et al., 1993 ; Böckers et al., 1996). Les cellules spécifiques de la PT sont petites, de forme ovoïde, et présentent des granules de sécrétion (Stoeckel et al., 1979) de nombre et taille variables suivant l'espèce. De même, la proportion relative de cellules gonadotrobes varie énormément selon l'espèce, et même l'individu. Elle est faible chez le rat (Baker et al., 1975 ; Gross, 1983). La présence de gonadotrobes dans la PT résulterait de leur migration à partir de la PD (Böckers et al., 1996). On retrouve dans la PT, tout comme dans la PD, la thyroid stimulating hormone (β -TSH), dont le rôle est de stimuler la production d'hormones thyroïdiennes ainsi qu'une co-localisation de la β -LH, régulant la synthèse de testostérone, donc marqueur de la régulation de l'activité sexuelle et de la follicle stimulating hormone (β -FSH), qui permet entre autre l'ovulation (Gross, 1983 et 1984 ; Sakaï et al., 1999 ; Rudolf et al., 1993 ; Dardente et al., 2003a ; Lincoln et al., 2005). On retrouve également l' α -GSU dans la PT, la sous-unité commune à ces hormones glycoprotéiques dont la spécificité leur est

conférée par la sous-unité β (Stoeckel et al., 1994 ; Wittkowski et al., 1988 ; Bockmann et al., 1996 et 1997 ; Böckers et al., 1994, 1995 et 1996 ; Bock et al., 2001). Chez la majorité des espèces étudiées, le nombre de cellules exprimant la sous-unité α semble supérieur à celui des cellules exprimant les différentes sous-unités β réunies. Il n'existe cependant pas de récepteurs spécifiques de cette sous-unité α et il semble qu'elle n'ait pas d'action physiologique propre (Morgan et al., 1996). Un raccourcissement de la photopériode ou des injections de mélatonine, entraînent une réduction des niveaux de β -TSH et d' α -GSU (Bockman et al., 1996 ; Bergmann et al., 1989 ; Wittkowski et al., 1988 ; Bockers et al., 1995 ; Dardente et al., 2003a ; Lincoln et al., 2005). L'expression de *mtl* co-localise avec l'expression de la β -TSH et de l' α -GSU chez le mouton et les hamsters, sibérien et d'Europe. De plus chez ce dernier, on observe une réduction de l'expression de la β -TSH et de l' α -GSU en SP (Klosen et al., 2002 ; Dardente et al., 2003a).

b. La mélatonine et la sécrétion de prolactine

La PRL présente des variations plasmatiques saisonnières chez les animaux de jours courts et de jours longs avec des valeurs maximales obtenues en LP dans les deux cas (Lincoln et al., 2003). Elle est produite par la PD et est impliquée dans de nombreuses variations saisonnières comme le changement de couleur de pelage ou la mue (Duncan et Goldman, 1984 ; Lincoln et al., 1996 ; Lincoln et Richardson, 1998). Comme la mélatonine présente une synthèse journalière directement sous le contrôle des NSC, l'hypothèse selon laquelle la mélatonine contrôle négativement le rythme saisonnier de PRL a été émise. Cependant, la PD ne possédant pas de récepteurs de la mélatonine chez l'adulte, l'effet de cette hormone est donc indirect (Vanecek, 1988 ; Vanecek et Kosar, 1994). La PT représente un site d'action majeur de la mélatonine puisqu'une très forte densité de récepteurs de la mélatonine y sont exprimés, chez tous les Mammifères étudiés (Vanecek et al., 1987 ; Weaver et al., 1989 ; Morgan et al., 1989 ; Masson-Pévet et al., 1994). Par des expériences *in vitro* où des cellules de PT et de PD sont mises en co-cultures, on observe que la PT ne libèrent pas la PRL mais elle stimule les cellules de la PD permettant ainsi sa libération (Hazlerigg et al., 1996 ; Morgan et al., 1996 ; Stirland et al., 2001). *In vivo*, l'importance de la PT pour le contrôle de la PRL et l'indépendance de l'axe reproducteur par rapport à cette hormone ont été montré par Malpaux ses collaborateurs. En effets, des micro-implants de mélatonine localisés dans la PT, diminuent les quantités produites de PRL mais sont sans effets sur celles de LH (Malpaux et al., 1994, 1995 et 2001). Cette adaptation physiologique de la PRL sous la

dépendance de la mélatonine, a été confirmé par d'autres protocoles d'injection de mélatonine et par déconnection hypothalamo-pituitaire chez le mouton qui ont montré une régulation directe de la PT sur la PD dans la sécrétion de la PRL (Lincoln, 1994 ; Lincoln et Clarke, 1994 et 1995). Enfin, la régulation de la sécrétion de la PRL par la mélatonine se fait *via* ses récepteurs MT₁ dans la PT. Ceci a été démontré chez des souris ayant une invalidation du gène *mt₁*, on observe augmentation des quantités de PRL circulante (VonGall et al., 2002).

La PT pourrait donc jouer un rôle sur la PD, en influençant la libération de messages hormonaux, ou en modulant le flux de ces signaux, ou bien encore en sécrétant un facteur propre. Pour expliquer cette observation, l'existence d'une hormone glycoprotéique spécifique de la PT, encore non identifiée, et appelée tubéraline, avait alors été évoquée (Stoeckel et al., 1994). Guerra et Rodriguez (2001) ont mis en évidence deux protéines libérées par la PT, mais elles n'ont pas encore été identifiées.

Le rôle saisonnier de la PT est sous-tendu par des voies moléculaires de régulation et donc par une rythmicité circadienne impliquant l'expression des gènes horloges.

c. La PT : mélatonine et gènes horloges

Tout comme dans les NSC, les gènes horloges sont exprimés dans la PT. Les gènes *per1*, *cry1*, *bmal1* et *clock* sont exprimés rythmiquement, alors que les gènes *per2* et *cry2* le sont de façon constante, dans la PT de la souris (VonGall et al., 2005 ; Albrecht et al., 1997). La PT présente également des variations photopériodiques dans l'expression des gènes horloges avec notamment une amplitude beaucoup plus faible en condition SP (Messenger et al., 1999, 2000 et 2001 ; VonGall et al., 2002). Il existe deux souches de souris qui sont habituellement comparées pour étudier le rôle de la mélatonine endogène : d'une part la C3H qui présente un rythme de synthèse de la mélatonine et d'autre part la C57Bl6 qui possède une mutation de l'une des enzymes impliquées dans la voie de synthèse de la mélatonine et qui par conséquent, ne présente pas de rythme de synthèse de cette hormone (Stehle et al., 2002). C'est grâce à une étude chez ces souris C57Bl6 mais également par des expériences de pinéalectomie chez les C3H, que l'équipe de Stehle a montré que les rythmes des gènes horloges dans la PT étaient contrôlés par la mélatonine. En effet, dès 2002, VonGall et ses collaborateurs montrent qu'une pinéalectomie chez des souris C3H, induit après 6 jours de récupération, la perte de l'expression rythmique de l'ARNm et de la protéine PER1. De plus,

lorsque de la mélatonine est injectée quotidiennement et dès la première nuit qui suit l'opération, on observe que ce rythme est partiellement conservé 6 jours après la pinéalectomie (VonGall et al., 2002). La comparaison des profils d'expression des gènes horloges dans la PT de souris sauvages avec ceux des souris ayant une invalidation pour les gènes *mt₁* et *mt₂*, a permis de montrer le rôle essentiel du récepteur MT₁ (VonGall et al., 2005). En effet, l'expression journalière de *per1*, *cry1*, *bmal1* et de *clock* n'est pas affectée par la mutation de *mt₂* mais par contre est inhibée chez les mutants du récepteur *mt₁*. Une autre démonstration fut apportée par des protocoles d'injections de mélatonine. En effet, une injection unique systémique de mélatonine effectuée en fin de nuit, suffit à abolir le pic de *per1* normalement présent en début de jour, chez le hamster syrien (Messenger et al., 1999). De même une injection de mélatonine en fin de jour induit de façon transitoire l'expression de *cry1* chez le rat (Dardente et al., 2003b). En effet, une injection vers CT 11.5 de mélatonine à 1mg/kg chez le rat, induit en à peine une heure après l'injection, une augmentation très forte du niveau d'expression de l'ARNm de *cry1* qui disparaît dès le milieu de la nuit subjective (Dardente et al., 2003b). En revanche, cette même injection de mélatonine (fin de jour subjectif) inhibe en partie le maximum d'expression de *per1* observé normalement en début de jour subjectif (Dardente et al., 2003b). On observe en effet, un maximum d'expression de *per1* chez les animaux injectés avec la mélatonine, mais chez ces animaux, le pic est plus petit que chez les animaux contrôles. Ainsi, *per1* et *cry1* semblent directement régulés par la mélatonine, mais de façon inverse. Mais la mélatonine ne serait pas la seule molécule impliquée dans le rythme d'expression des gènes horloges (VonGall et al., 2002). L'implication des récepteurs à l'adénosine a été évoquée dans le niveau d'expression de *per1*. En effet, les récepteurs A_{2b} couplés à l'AC sont présents en grande quantité dans la PT (Stehle et al., 1992 et 1995). Chez le hamster sibérien pinéalectomisé, une injection d'agoniste de ce récepteur, le 5' N Ethyl Carboxamid Adenosine (NECA) pendant six jours, permet la restauration du rythme de l'ARNm de *per1* et de sa protéine (VonGall et al., 2002). De même chez les souris pinéalectomisées, le rythme de *per1* est restauré complètement ainsi que son amplitude par une administration conjointe de mélatonine (1 µg/g de poids corporel) et de NECA (VonGall et al., 2002). L'hypothèse évoquée serait une sensibilisation par la mélatonine de la voie de signalisation de l'AC de façon temps dépendant, et l'absence de mélatonine par pinéalectomie ou mutation génétique, engendrerait la perte de cette sensibilisation.

3. Les effets de la mélatonine sur le système circadien

Les NSC transmettent un signal nerveux circadien à la glande pinéale qui le traduit en un message endocrine : la mélatonine. Pendant la nuit, la pinéale libère une hormone, la mélatonine, dans la circulation sanguine. La présence des récepteurs de la mélatonine dans les NSC, leur permettent de recevoir le message mélatoninergique suggérant ainsi un rétrocontrôle de l'hormone sur l'horloge endogène (Weaver et al., 1988 ; Vanecek et al., 1987 ; Reppert et al., 1988). Cependant, encore à l'heure actuelle, le rôle physiologique exact de la mélatonine sur l'horloge demeure inconnu. L'un des effets de la mélatonine les mieux décrits est la resynchronisation des rythmes circadiens observée chez des animaux placés en libre cours.

a. L'entraînement de l'horloge par la mélatonine

Les premières expériences d'injections quotidiennes de mélatonine ont montré que cette hormone était capable de provoquer l'entraînement du rythme d'activité locomotrice du rat placé en libre cours (Redman et al., 1983 ; Redman et Armstrong, 1988 ; Armstrong et al., 1986 ; Cassone et al., 1986). Elle est capable d'induire un déphasage du rythme d'activité de l'AA-NAT sous le contrôle de l'horloge, suggérant que cette hormone provoquerait si ce n'est un entraînement de l'horloge, au moins une avance de phase de son activité (Humlova et Illnerova, 1990). Cependant, ce protocole d'injections quotidiennes a l'inconvénient de devoir manipuler l'animal et cette manipulation pouvait avoir par elle seule des effets sur l'activité des NSC. Pour y pallier, une technique d'infusion intracérébrale a été utilisée par la suite, évitant ainsi toute manipulation de l'animal (Drijfhout et al., 1996 ; Pitrosky et al., 1999). Des infusions de mélatonine ou de l'agoniste S20098 des récepteurs mélatoninergiques sont capables **d'entraîner le rythme de l'activité locomotrice**. En effet, Pitrosky et ses collaborateurs ont montré que des infusions quotidiennes de mélatonine (pendant une heure, 8 heures ou 16 heures) chez des rats placés en DD, sont capables d'entraîner, à précisément 24 heures, le rythme d'activité locomotrice de l'animal. Il est cependant nécessaire que le début de l'apport en mélatonine exogène coïncide avec le début de la période d'activité locomotrice (Pitrosky et al., 1999). De plus, les auteurs ont montré qu'un protocole de deux infusions de mélatonine d'une heure chacune, séparées par une fenêtre temporelle de 14 heures, était suffisant pour entraîner à 24 heures, le rythme d'activité locomotrice de rats placés en DD. Cette expérience suggère que l'effet de la mélatonine nécessite une coïncidence temporelle entre la présence de l'hormone et le niveau de sensibilité de l'horloge.

La mélatonine a un intérêt chronobiotique chez l'homme. Son administration par voie orale a également un effet sur l'horloge. En effet, tout comme chez les rongeurs, l'administration chez l'homme de mélatonine à la transition jour/nuit, induit une avance de phase de l'horloge. De plus, si la mélatonine est prise à la transition nuit/jour, on observe chez le sujet un retard de phase (Lewy et al., 1992). Ces aspects chronobiotiques sont surtout importants pour les personnes présentant des troubles du rythme veille/sommeil telles que les personnes aveugles ou les passagers de vols transméridiens. Des travaux ont été effectués chez ces derniers et montrent qu'une administration de 5 mg de mélatonine vers 18 h, durant les trois jours précédant le vol (d'ouest en est), favorise la resynchronisation de l'horloge (pour revue Arendt, 1999). De même chez des personnes aveugles, on peut recadrer le rythme de veille/sommeil par une prise quotidienne de mélatonine de 0.5 mg à 10 mg, aux environs de CT 23 (Lockley et al., 2000 ; Sack et al., 2000).

Les effets d'une injection unique de mélatonine sur l'activité de l'horloge, consiste en une courbe de réponse de phase sur 24 heures. Cette dépendance temporelle de l'effet mélatoninergique pourrait être expliquée par des fenêtres temporelles de sensibilité de l'horloge pour la mélatonine (Cassone, 1990 ; Benloucif et Dubocovich, 1996 ; Pévet et al., 2002). Lorsque l'injection est pratiquée à une heure où l'horloge n'est pas sensible à la mélatonine, on n'observe aucun effet, alors que si elle est faite dans les périodes où l'horloge est sensible, la mélatonine induit une avance de phase de l'horloge.

b. Les injections de mélatonine *in vivo*

Une injection unique de mélatonine (1mg/kg) en fin de jour subjectif provoque **une avance de phase de l'activité locomotrice** chez les rongeurs et cet effet est maximal quand la mélatonine est injectée entre CT 9.5 et CT 11.5 (Sharma et al., 1999). Chez la souris, une injection de mélatonine pendant trois jours consécutifs, en fin de jour subjectif, induit un déphasage du rythme de l'activité locomotrice (Benloucif et Dubocovich, 1996). L'administration conjointe d'un antagoniste partiel du récepteur MT₂, le 4-phénylpropionimidotétraline (4P-PDOT) et de mélatonine, abolit cette avance de phase (Hunt et al., 2001). Cependant, chez le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) où le récepteur mt₂ n'est pas fonctionnel, ce déphasage est également observé (Weaver et al., 1996). De plus, chez des souris ayant un fond génétique C3H/HeN-C57Bl6 et présentant une invalidation pour le gène mt₁, il y a disparition du déphasage du rythme de l'activité locomotrice provoqué par trois

injections de mélatonine en fin de jour subjectif (Dubocovich et al., 2005). L'implication conjointe des récepteurs MT_{1/2} est donc l'hypothèse la plus probable dans ce phénomène de déphasage de l'activité locomotrice (Liu et al., 1997 ; Dubocovich et al., 1998 ; Hunt et al., 2001). Le déphasage de l'horloge induit par une injection de mélatonine est le plus simple à étudier quand aux effets pharmacologiques. De même, il a été montré qu'une injection de mélatonine est capable d'augmenter l'amplitude de la sécrétion endogène de mélatonine (Bothorel et al., 2002). Enfin, une injection unique de mélatonine en fin de jour subjectif, provoque également une avance de phase immédiate de l'expression de *c-fos* induite par la lumière dans les NSC de rat (Sumova et Illnerova, 1996). En effet, l'application de créneaux lumineux pendant la nuit subjective, stimule fortement l'expression de *c-fos* dans les NSC de rats, alors que chez des animaux placés en DD, l'expression de *c-fos* reste indétectable dans cette même région. Ainsi, une avance de phase immédiate de l'expression de *c-fos* induite par la lumière dans les NSC de rat en réponse à une injection unique de mélatonine est le marqueur d'une avance de phase immédiate de l'oscillation circadienne des NSC.

Tous ces effets sont à la base de l'intérêt chronobiotique de la mélatonine car elle agit directement sur l'horloge et sur son activité circadienne. Cependant, cet effet de la mélatonine reste pharmacologique car elle agit à des heures où elle est normalement absente (fin de jour) et à des concentrations non physiologiques (E.G.; 0.25 mg/h/kg, Pitrosky et al., 1999). Dans le but de comprendre comment la mélatonine agit, une approche *in vitro* a été privilégiée, avec des cultures de NSC où les concentrations de mélatonine utilisées (1 nM) sont compatibles avec les concentrations de mélatonine plasmatique.

c. Une approche *in vitro*

L'application *in vitro* de mélatonine **inhibe l'activité électrique des NSC** (Mason et Brooks, 1988 ; Mason et Rusak, 1990 ; Shibata et al., 1989 ; Stehle et al., 1989). Lorsque la mélatonine (1 nM à 100 nM) est appliquée au moment où l'activité électrique spontanée est maximale (CT 4.5 et CT 6.5), elle induit une forte diminution de cette activité électrique, de façon dose dépendante. Les récepteurs de la mélatonine MT₁ et MT₂ semblent être capables l'un comme l'autre d'inhiber l'activité électrique spontanée des NSC (Jin et al., 2003 ; Liu et al., 1997). On peut penser que cette inhibition résulterait d'une association de ces récepteurs avec les canaux potassiques Kir 2.3 comme cela a déjà été montré dans les œufs de Xénope.

La mélatonine peut également induire un **déphasage du rythme d'activité électrique** de tranches de NSC de rat et de hamster sibérien mises en culture. Cet effet n'est observé que quand la mélatonine est appliquée entre CT 9 et CT 15 ou entre CT 22 et CT 02 (McArthur et al., 1991 et 1997 ; Starkey et al., 1995 ; Starkey, 1996 ; Weaver et al., 1996). Cette avance de phase définitive, est obtenue à des concentrations de mélatonine de 1 nM, proches des concentrations plasmatiques de mélatonine (340-650 pM) et donc compatibles avec son action physiologique (McArthur et al., 1991 ; Gillette et McArthur, 1996). Ces valeurs sont proches du K_D de ses récepteurs et dans ces conditions, seuls MT_1 et MT_2 sont capable de lier la mélatonine. L'intensité du déphasage dépend du moment de l'application de la mélatonine sur les tranches de NSC (McArthur et al., 1997). En effet, un déphasage maximum est observé lorsque la mélatonine est appliquée à CT 10 et CT 23 avec une avance de phase de 4 heures du rythme de l'activité électrique spontanée. Une invalidation du gène *mt₁* ne permet aussi plus l'inhibition de l'activité électrique spontanée des NSC par la mélatonine, suggérant que cet effet est dû à l'activation de la voie MT_1 (Liu et al., 1997 ; Jin et al., 2003). L'action de la mélatonine se ferait par une activation de la voie de la PKC. La première étape de cette cascade de transduction serait une activation de la PLC par les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine $G_{i/o}$ couplée aux récepteurs mélatoninergiques (McArthur et al., 1997).

V. Conclusions et objectifs de mon travail

Il est clairement établi que l'activité endogène de l'horloge biologique circadienne des Mammifères localisée dans les NSC, est synchronisée aux 24 heures astronomiques par l'alternance jour-nuit. Ce message circadien est ensuite distribué par voie nerveuse vers de nombreuses structures cérébrales dont la glande pinéale qui synthétise et secrète la mélatonine pendant la nuit, directement dans la circulation sanguine. Cette hormone est donc susceptible de transmettre l'information jour/nuit à tous les tissus exprimant des récepteurs dont elle est le ligand naturel.

Chez le rat, lorsque la mélatonine est administrée à des moments précis du cycle jour/nuit, elle entraîne des modifications immédiates de nombreux rythmes circadiens contrôlés directement par l'activité des NSC. De même, les effets de la mélatonine observés *in vitro* sur l'horloge, semblent donc être engendrées par les récepteurs MT_{1/2}. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle la mélatonine a un rôle physiologique sur l'horloge circadienne. Cependant à l'heure actuelle ce rôle n'est pas encore connu. En effet, *in vivo*, seules des concentrations pharmacologiques sont capables d'agir sur l'horloge. De même, la cascade moléculaire de transduction du signal mélatoninergique n'est que partiellement identifiée.

Afin de mieux comprendre l'action de la mélatonine et de contourner ce problème, une autre approche par l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les effets observés de la mélatonine (avance de phase ou saisonnier) est utilisée par le laboratoire. Les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer la genèse d'une oscillation circadienne sont maintenant partiellement élucidés. Chez les Mammifères, 7 gènes (*per1*, 2, 3, *clock*, *bmal1*, *cry1* et 2), appelés gènes "horloge", ont été identifiés ainsi que 2 récepteurs orphelins (*rev-erbα* et *rorα*) qui sont des facteurs de transcription. Les protéines correspondantes interagissent et régulent la transcription de leurs propres ARNm par des boucles de rétrocontrôles positifs et négatifs. Ces boucles de régulations complexes constituent les bases moléculaires de l'oscillation circadienne. Les patrons d'expression des ARNm et des protéines sont donc eux-mêmes des paramètres très fiables, permettant de caractériser le temps circadien et donc de quantifier les effets de différents synchroniseurs (photiques ou non photiques) ou les effets d'agents

chronobiotiques. Cependant, les gènes horloges ne sont pas les effecteurs directs de la mélatonine dans les NSC (Poirel et al., 2003b).

Des études ont montré qu'un autre membre des récepteurs orphelins, *rorβ* présente un lien avec la mélatonine, à la fois dans la glande pinéale et dans la PT. En effet, le rythme d'expression de ce gène est positivement corrélé avec celui de la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale. De même, une pinéalectomie provoque la disparition du rythme d'expression de *rorβ* dans la PT. Ces récepteurs orphelins pourraient donc être des modulateurs des boucles de régulation circadienne.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces récepteurs orphelins pourraient représenter des cibles de la mélatonine. Afin de tester cette hypothèse j'ai observé la réponse de ces gènes dans deux conditions : la première condition étant une approche chronobiotique après une injection pharmacologique unique de mélatonine. Nous avons voulu savoir si les récepteurs orphelins sont le lien entre les effets chronobiotiques de la mélatonine sur l'horloge circadienne et le cœur de l'horloge moléculaire circadienne. Pour cela, nous avons étudié l'influence de la mélatonine injectée en fin de jour subjectif (heure circadienne où il est connu que la mélatonine a des effets chronobiotiques sur l'horloge des NSC) sur les profils d'expression de ces deux gènes. L'injection à des doses pharmacologiques de mélatonine en fin de jour subjectif est un protocole engendrant à la fois des effets moléculaires et comportementaux chez le rat. C'est un bon moyen d'étude des cascades de transduction de la mélatonine dans les NSC même s'il ne reflète pas l'action ou le rôle physiologique de la mélatonine sur l'horloge. La seconde condition a été d'étudier la mélatonine en situation « physiologique ». Nous avons étudié l'expression des récepteurs orphelins chez des animaux dont la source de mélatonine endogène avait été supprimée par pinéalectomie 8 jours auparavant. En parallèle, un second groupe d'animaux pinéalectomisés a reçu un apport de mélatonine dans l'eau de boisson. Les rats buvant essentiellement la nuit, ce protocole restaure le rythme de mélatonine endogène circulante (Slotten et al., 1999 ; Pitrosky et al., 1999a et 1999b).

Mon travail a donc porté sur "Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de la mélatonine sur les noyaux suprachiasmatiques, rôle de trois récepteurs orphelins."

MATERIELS ET METHODES



I. Les animaux

Ce travail a été réalisé sur des rats Wistar mâles adultes de 220-250 g (Dépré, S^tDoulchard, France) élevés en cycle lumière-obscurité 12 : 12 (LD, 12 heures de jour, 12 heures de nuit) depuis la naissance et disposant de nourriture et d'eau à volonté. Pendant les phases nocturnes, une lumière rouge (inférieure à 1 lux) reste allumée en permanence pour faciliter les manipulations à l'obscurité.

Le rat a été choisi pour les études circadiennes des régulations physiologiques des récepteurs de la mélatonine et de l'effet de la mélatonine sur les NSC, car c'est un animal chez lequel les récepteurs de la mélatonine sont fonctionnels et exprimés au niveau des NSC et de la PT (Reppert et al., 1995 ; Weaver et Reppert, 1996) Cette espèce a aussi été beaucoup utilisée dans la caractérisation des effets chronobiotiques de la mélatonine (Poirel et al., 2003b ; Sharma et al., 1999).

II. La Chirurgie

Chez les rongeurs, la glande pinéale est située sous les méninges entre les hémisphères cérébraux et le cervelet. Cette zone est placée à l'aplomb du point lambda qui est facilement repérable sur la voûte de la boîte crânienne (suture osseuse pariéto-occipitale). Les rats sont injectés par voie intra-péritonéale avec un mélange d'anesthésique composé de Zolétil 20 (Virbac®, 0,04 mg/g de poids corporel) et de Rompun 2% (Bayer®, 0,01 mg /g de poids corporel). L'effet anesthésique est observé en moins de 5 minutes et se prolonge pendant plus de trois heures. Les rats anesthésiés sont ensuite placés dans un appareil de stéréotaxie, la tête est fixée entre les deux barres d'oreilles afin d'empêcher tout mouvement horizontal et le museau est maintenu par la barre d'incisives pour éviter une rotation autour des barres d'oreilles. La peau du crâne est incisée sur une longueur de 2 à 3 cm. Une trépanation de 5 mm de diamètre à l'aplomb du lambda est effectuée. La pinéale située sous le sinus veineux, est extraite à l'aide de pinces fines, la calotte osseuse est alors remplacée. L'hémorragie provoquée par la chirurgie est arrêtée par l'application d'un petit carré de gaze hémostatique résorbable (Spongel®), entre la peau et le crâne. La peau de l'animal est refermée à l'aide d'agrafes chirurgicales de 7,5 mm.

III. L'apport en mélatonine

La mélatonine a des effets pharmacologiques induisant une modification de la phase de l'horloge. Nous avons pratiqué une injection pharmacologique unique de mélatonine en fin de jour subjectif. Ce protocole est connu pour provoquer une avance de phase de deux heures du rythme d'activité locomotrice chez le rat. Les animaux témoins et ceux injectés à la mélatonine, ont été placés en DD à partir du début normal de la nuit (CT 12) précédant le jour où les premiers animaux ont été sacrifiés (soit environ 24 h). Les animaux du groupe mélatonine reçoivent une injection de 250 µl de solution de mélatonine diluée dans l'éthanol est préparée avec une concentration finale de 1 mg/ml en intra-péritonéale. Les animaux contrôles reçoivent une injection avec la solution ayant servi à la dilution de la mélatonine. Toutes les injections sont pratiquées sous lumière rouge de faible intensité pour ne pas faire intervenir la lumière.

Une pinéalectomie a été pratiquée chez les rats pour induire une absence chronique de la mélatonine physiologique. De plus, un autre groupe d'animaux pinéalectomisés reçoivent un supplément en mélatonine dans l'eau de boisson dès leur réveil de l'opération. Les rats buvant essentiellement la nuit, ce protocole mime parfaitement les variations journalière de mélatonine circulante (Pitrosky et al., 1999 ; Slotten et al., 1999b) et nous permet de confirmer que les effets que nous observons après une pinéalectomie disparaissent par cette supplémentation. L'eau de boisson est changée tous les deux ou trois jours. Elle consiste en 500 ml d'eau à laquelle est ajouté 1 ml de solution stock de mélatonine (7.5 mg/ml diluée dans l'éthanol). Après une période de récupération de 8 jours à 3 mois, les animaux témoins et pinéalectomisés, ont été placés en DD à partir du début normal de la nuit (CT 12) précédant le jour où les premiers animaux ont été sacrifiés.

IV. Le sacrifice des animaux

Tous les sacrifices ont été effectués en lumière rouge. A chaque point horaire, 5 animaux ont été sacrifiés de chaque groupe de rats (contrôle, pinéalectomisés, supplémentés en mélatonine dans l'eau de boisson, injectés avec du salin, injectés avec de la mélatonine). Les cerveaux ont été rapidement prélevés et placés directement sur de la carboglace pour une congélation rapide et homogène puis conservés au congélateur à -20°C. Les cerveaux ont ensuite été sectionnés au niveau des NSC et de la PT en coupes frontales de 20 µm d'épaisseur à l'aide du cryostat à -18°C. Les coupes ont été récupérées sur des lames

gélatinées (1,5% de gélatine et 0,1% d'alun de chrome) préalablement stérilisées. Les lames sont ensuite stockées dans des boîtes fermées à -20°C, jusqu'à l'hybridation *in situ*.

V. L'hybridation *in situ*

A. Principe

La technique d'hybridation *in situ* (HIS) permet la détection et la localisation d'ARNm spécifiques. Elle consiste à incuber des coupes de tissus en présence de fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de séquence complémentaire à la séquence de l'ARNm recherché. L'acide nucléique exogène appelé une sonde, est préalablement marqué par des radio-isotopes (par incorporation de ³⁵S-UTP en l'occurrence) permettant ainsi de détecter sur film autoradiographique, l'interaction entre l'ARNm et la sonde. Les sondes de type ARN présentent l'avantage de pouvoir agir à une stringence élevée en raison de l'importante stabilité des hybrides ARN-ARN (ARNm-ribosonde) et permettent par conséquent, d'éliminer plus aisément le marquage non spécifique. Cependant, les molécules d'ARN étant très facilement dégradées par les RNases, il est donc extrêmement important d'utiliser du matériel qui en est exempt. La sonde ARN est obtenue après transcription *in vitro* du fragment d'ADN cloné dans un vecteur contenant des sites d'initiation de la transcription (promoteurs) placés de part et d'autre de l'ADN inséré. Des ARN polymérases ADN-dépendantes différentes ont été utilisées. Elles reconnaissent chacune spécifiquement l'un des sites promoteurs sur le vecteur linéarisé.

Cette méthode permet la genèse, soit d'un transcrit *antisens* soit d'un transcrit *sens*. Le transcrit *antisens* possède la séquence complémentaire de celle de l'ARNm endogène recherché. Ces sondes vont donc s'hybrider avec les ARNm recherchés. C'est le signal spécifique auquel s'ajoutent cependant, des hybridations non spécifiques que les traitements post-hybridation ne peuvent totalement supprimer. Le signal obtenu est donc un signal dit « total » (somme du signal spécifique et du signal non spécifique). Le transcrit *sens* possède, quand à lui, une séquence identique à celle de l'ARNm recherché. Ces sondes *sens* ne peuvent donc pas s'hybrider spécifiquement avec les ARNm étudiés. Les signaux détectés sont donc dits non spécifiques. Ces sondes servent de contrôle pour la spécificité du signal.

f1 (+) origin 135–441
 β -galactosidase α -fragment 460–816
 multiple cloning site 653–760
 lac promoter 817–938
 pUC origin 1158–1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1978–2833

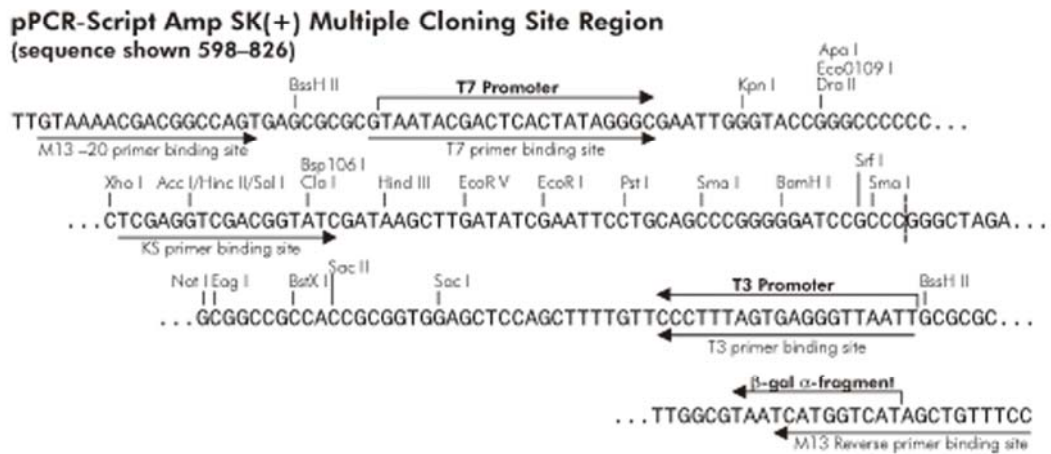
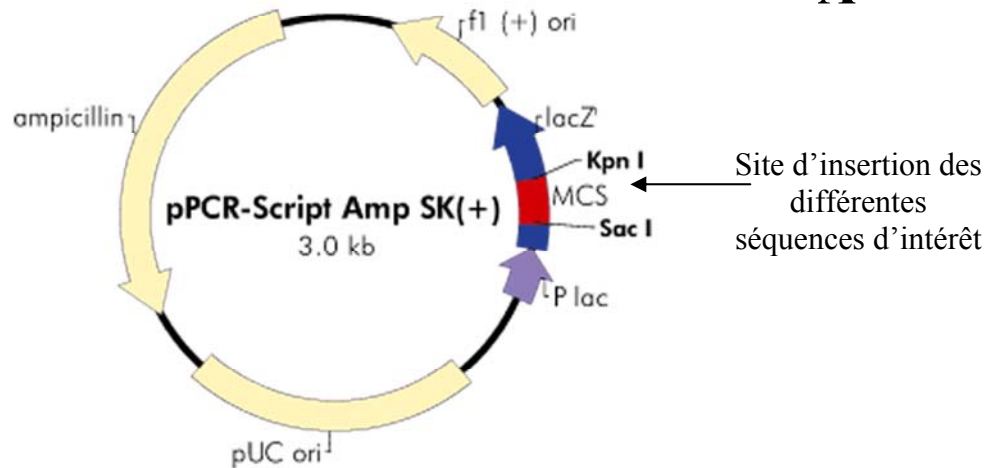


Figure 14 : (A) Carte du vecteur *pCR-Script Amp SK(+)* cloning vector (Stratagene) (B) séquence du site multiple de clonage.

B. Clonage des gènes utilisés

J'ai personnellement cloné une partie du gène *rora* (accès sous GenBank : NM 013646 nucléotides de 752-1234). J'ai effectué une amplification par PCR (polymerase chain reaction) à partir d'ADNc de cerveau et des oligonucléotides afin d'obtenir un fragment de 482 paires de bases comme décrit par Chauvet et ses collaborateurs (Chauvet et al., 2002). Les primers utilisés sont les suivants :

rora 5' : 5' GTCAGCAGCTTCTACCTGGAC 3'

rora 3' : 5' GTGTTGTTCTGAGAGTGAAAGGCACG 3'

La taille du produit de PCR obtenus est vérifiée sur gel d'agarose (agarose 1%, 1µl bromure d'éthidium -BET- 10mg/ml). Les gènes sont ensuite clonés en suivant le protocole pCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene) (cf. figure 16). L'ADN est inséré dans le vecteur pBluescript selon le protocole du fabricant (Stratagène). Les vecteurs ainsi obtenus sont ensuite transfectés dans des bactéries compétentes. L'insertion à la fois du plasmide et du vecteur est vérifiée par une mise en culture sur une plaque LB-agar ayant de l'ampicilline, du X-gal à 2% et de l'IPTG. Les colonies ayant poussé et qui sont restées blanches, sont celles qui contiennent le plasmide et l'insert. Les plasmides récupérés sont séquencés (AGOWA sequencing services, Germany) afin de vérifier l'orientation et l'identité du fragment d'ADNc cloné. La séquence obtenue est conforme à celle enregistrée dans PUBMED : *Rattus norvegicus rora* NM 013646 nucléotides 752-1234. Les autres plasmides utilisés pour les travaux présentés dans ce mémoire ont été générés par Hugues Dardente au sein du laboratoire (cf. tableau 4). Enfin, les séquences partielles d'ADNc de *Rattus norvegicus* de *per1* (981 bp) et *per2* (760 bp) nous ont été données par le Professeur H. Okamura (Department of Anatomy and Brain Science, Kobe University School of Medicine, Japan).

gène	espèce	nucléotides	GenBank	article
<i>rev-erbα</i>	<i>Mus musculus</i>	908-1890	NM 145434	Preitner et al., 2002
<i>rorβ</i>	<i>Mus musculus</i>	980-1742	XM 129222	Becker-André et al., 1993
<i>bmal1</i>	<i>Mus musculus</i>	55-1807	NM 007489	
<i>rora</i>	<i>Mus musculus</i>	752-1234	NM 013646	Chauvet et al., 2002

Tableau 3 : Séquence des différents gènes clonés au sein du laboratoire.

5' GTC AGC AGC TTC TAC CTG GAC ATC CAG CCC TCC CCA GAC CAG TCG GGA
 TTG GAC ATC AAT GGG ATC AAA CCC GAA CCC ATA TGT GAC TAC ACA CCA
 GCA TCT GGC TTC TTC CCC TAC TGT TCC TTC ACC AAC GGA GAG ACT TCC
 CCA ACC GTG TCC ATG GAG AGA CTA GAA CAC CTT GCC CAG AAC ATA TCC
 AAA TCC CAC CTG GAA ACC TGC CAG TAC TTG CGG GAA GAG CTC CAG CAG
 ATA ACG TGG CAG ACC TTC CTG CAG GAG GAG ATT GAA AAC TAC CAG AAC
 AAG CAG AGA GAG GTG ATG TGG CAG CTG TGT GCC ATC AAG ATT ACA GAA
 GCA TTC CAG TAT GTG GTG GAG TTT GCC AAA CGC ATT GAT GGA TTT ATG
 GAG CTG TGT CAA AAT GAT CAA ATT GTG CTT CTA AAA GCA GGC TCG CTA
 GAG GTG GTG TTT ATT AGG ATG TGC CGT GCC TTT AGC TCT CAG AAC AAC
AC 3'

Figure 15.: Séquence nucléotidique de la sonde ror α que j'ai clonée dans le cervelet de rat.

La séquence obtenue est conforme à celle enregistrée dans PUBMED : *Rattus norvegicus* ror α NM 013646 nucléotides 752-1234

Les ribosondes sont obtenues à partir de la transcription d'ADN complémentaire de souris (ADNc) ou de rat. Des stocks à -80°C de bactéries *Escherichia coli* XL10 transformées par des plasmides recombinants détenant la majorité des gènes d'intérêt, sont disponibles au laboratoire. La synthèse des sondes se déroule en deux étapes : extraction et linéarisation des plasmides puis transcription de la zone d'intérêt. Ces étapes sont semblables pour chaque gène et sont détaillées plus particulièrement pour l'obtention des sondes antisens (AS) et sens (S) de *rora*.

C. Les plasmides

Une partie du gène d'intérêt est inséré au niveau du site de clonage multiple du plasmide qui, dans le cas de *rora*, est un pBluescript (Promega) (cf. figure 14). La mise en culture d'une partie du stock de bactéries, prélevée avec un cure dents à proximité d'un bec Bunsen, s'effectue dans 100 ml de milieu LB (NaCl 0.17 M ; 10 g tryptone ; 5 g d'extraits de levure ; qsp 1 litre d' H_2O autoclavée) en présence d'ampicilline ($100\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sous agitation à 37°C pendant 16 heures. Les bactéries XL10 étant sensibles à cet antibiotique, qui ne peuvent donc pas se multiplier en sa présence. Mais, si elles contiennent le plasmide pBluescript possède un gène de résistance à cette ampicilline, elles peuvent donc la dégrader et se diviser normalement et par conséquent dupliquer le plasmide.

L'extraction des plasmides est réalisée suivant le protocole QIAfilter (Qiagen Plasmid Purification Handbook, 1997). Les plasmides extraits sont ensuite dilués pour atteindre une concentration finale de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (déterminée avec un spectrophotomètre Uvikon 922, Bio-Tek Kontron). Ensuite, $50\text{ }\mu\text{l}$ de plasmides sont linéarisés (37°C ; 1 nuit) par $6\text{ }\mu\text{l}$ d'une enzyme de restriction spécifique $10\text{ U}/\mu\text{l}$ (NotI pour la sonde AS et BamHI pour la sonde S, Fermentas), en présence de $5\text{ }\mu\text{l}$ de tampon d'enzyme 10X (Fermentas).

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

1X) l'ADN est visualisé sous lumière UV à 254 nm. Comme la conformation d'un plasmide linéaire diffère de celle d'un plasmide circulaire, la distance parcourue par le front de migration doit être différente.

L'ADN linéarisé est ensuite purifié par une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Ainsi, l'ADN est mis en présence de 100 µl de phénol/chloroforme/Iso-amyl-ol (v/v/v : 25/24/1), 50 µl d'acétate d'ammonium 5 M et 30 µl d'eau. Après centrifugation (13000 g ; 20 min ; 4°C), la phase aqueuse contenant l'ADN, est prélevée (environ 80 µl) en évitant de prélever les débris situés à l'interface des phases. Sa précipitation est alors effectuée en y ajoutant 100 µl d'éthanol 100% et favorisée par l'acétate d'ammonium en plaçant l'ensemble à -20°C pendant 2 heures puis une seconde centrifugation est effectuée, dans les mêmes conditions. Le culot ainsi obtenu est lavé deux fois par de l'éthanol 80% (-20°C) puis centrifugé afin d'éliminer les sels. Le culot est enfin repris dans de l'eau autoclavée pour obtenir une concentration de plasmides linéarisés de 1 µg/µl (déterminée par spectrophotométrie).

Gène	Taille insert (pb)	Enzyme de restriction		ARN polymérase		origine
		AS	S	AS	S	
<i>rper1</i>	981	Sal1	Sph1	T7	SP6	Pr. Okamura
<i>rper2</i>	760	Nde1	Nco1	T7	SP6	Pr. Okamura
<i>mbmal1</i>	1752	Sal1	Sac1	T3	T7	Dr. Dardente
<i>mrev-erba</i>	983	Not1	BamH1	T7	T3	Dr. Dardente
<i>mroraβ</i>	762	BamH1	Not1	T3	T7	Dr. Dardente
<i>mroraα</i>	482	Not1	BamH1	T7	T3	Clonage personnel

Tableau 4 : Récapitulatif des enzymes nécessaires à la synthèse de ribosondes.

D. Synthèse des sondes

1. Synthèse

Les ADNc partiels codant pour les différents gènes ont été transcrits *in vitro* en présence d'ARN polymérases T3 ou T7 (T3 générant une sonde AS et T7 une sonde S dans le cas de *roraα*) afin de synthétiser respectivement un transcrit antisens ou sens selon le protocole

suivant : 1 µg de plasmide linéarisé est incubé pendant deux heures à 37°C dans un volume réactionnel final de 20 µl contenant : 2 µl de tampon de transcription fourni par le fabricant (Maxiscript, Ambion, Austin, TX, USA) additionné de 0,5 mM d'ATP ; 0.5 mM de CTP ; 0.5 mM de GTP ; 12.5 µM d'UTP froid ; 50 µCi de α -³⁵S-UTP (1250 Ci/mmol, Amersham, Saclay, France) et de 10 unités de l'une des ARN polymérases (Ambion). Au bout de 2 heures d'incubation, 1 µl de DNases (DNases/RNases free, Ambion) est ajouté au milieu réactionnel, afin de fragmenter le vecteur bactérien, et le tube est remplacé à 37°C pendant 15 min supplémentaires.

2. Purification

Afin d'éliminer l'ADN bactérien clivé, ainsi que les nucléotides non incorporés dans la sonde, un mélange de phénol/chloroforme (100 µl), d'acétate d'ammonium 5 M (70 µl), et d'eau autoclavée (30 µl), est ajouté au milieu réactionnel. Les tubes sont ensuite placés sur de la glace pendant 10 minutes, après avoir été vortexés brièvement. Ils sont ensuite centrifugés à 4°C à 13000 g pendant 10 min. Le surnageant est repris (environ 100 µl) puis complété par 10 µl d'ARNt à 3 mg/ml (torula yeast) et de l'éthanol 100% stocké à -20°C (2.5 volumes soit 250 µl). Les tubes sont stockés à -20°C pendant 2 heures, pour permettre la sédimentation, puis centrifugés pendant 15 minutes à 13000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot est lavé avec 400 µl d'éthanol 80% (stocké à -20°C), centrifugé à 4°C 10 min à 13000 g et puis repris et solubilisé dans 98 µl d'eau autoclavée et 2 µl de DTT 1 M (concentration finale 20 mM). La radioactivité émise par 1 µl de sonde est alors comptée dans 4 ml de liquide à scintillation (Packard, USA).

E. Protocole d'hybridation *in situ*

1. Etapes de pré-hybridation

Les lames sorties du congélateur (-20°C) sont placées sur des portoirs préalablement autoclavés. Afin de permettre la fixation et la préservation des morphologies originelles ainsi que l'inhibition des ribonucléases endogènes, les lames sont préalablement traitées dans un bain de paraformaldéhyde 4% (PAF) et PBS 2X pendant 15 min puis rincées successivement dans un bain de PBS 1X, puis de SSC 2X, pendant 2 min chacun. Afin d'éviter les interactions électrostatiques avec les sondes, l'acétylation des groupements amines chargés positivement est obtenue par un traitement des lames au tétra éthyle ammonium (TEA) 0.1 M

contenant 0.5% d'acide acétique anhydre placé sous agitation constante pendant 10 min. Après deux rinçages successifs dans du SSC 2X, puis du PBS 1X pendant 2 min chacun, les lames sont déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70, 90, 95, 100%, 1 min chacun) et séchées à l'air libre.

2. Hybridation

La sonde est mélangée au milieu d'hybridation pour une concentration finale de $20 \cdot 10^6$ DPM/ml, préalablement chauffée, puis maintenue à 54°C. Sur chaque lame, 70 µl de milieu d'hybridation sont déposés. Les coupes sont alors recouvertes par des lamelles préalablement siliconées puis autoclavées, pour permettre un meilleur étalement en une couche régulière du milieu d'hybridation contenant la sonde et limiter la déshydratation. Les lames sont ensuite déposées dans une chambre humide (SSC 2X, formamide 50%) pour limiter l'évaporation du milieu d'hybridation au contact des coupes et incubées à 54°C pendant 16 heures.

3. Etapes de post-hybridation

Le jour suivant l'hybridation, après avoir retiré les lamelles, le milieu d'hybridation est éliminé par immersion des lames dans un bain de SSC 2X pendant 2 fois 5 min. Les coupes sont ensuite traitées pendant 30 min à 37°C par des Ribonucléases A (solution stock 2 µg /ml à 79 kUI/mg, Sigma), 7 µl/200 ml dans un tampon composé de Tris 10 mM (pH 7.4), de NaCl 0.5 M et d'EDTA 10 mM (tampon RNases). Ce traitement permet la dégradation des liaisons aspécifiques. Les lames sont ensuite rincées successivement par des bains de stringence croissante pour éliminer au maximum les hybridations non spécifiques (SSC 4X, 2X, 0.5X à 54°C et 0.2X à 62°C). Les coupes sont enfin déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70, 90, 95, 100% contenant 0.3 M d'acétate d'ammonium, 1 min chacun) puis séchées à l'air libre.

VI. Autoradiogramme : réalisation et quantification

A. Principe

Les émissions β dues au ^{35}S ionisent les cristaux d'argent contenus dans le plan du film formant une image latente. Par immersion du plan du film dans un bain de révélation et de fixation, une image visible de grains d'argent métalliques est formée et les cristaux non ionisés sont dissous. Le marquage est obtenu au niveau des sources d'émissions β^- . L'intensité de ce marquage dépend de la quantité de ^{35}S présent, liée à la quantité de sondes hybridées.

B. Protocole

Les lames sont disposées dans une cassette d'exposition en présence d'un standard contenant des quantités connues de radioactivité, puis un film radiosensible est apposé (Bio Max MS-1, Kodak), sous lumière rouge, en contact direct avec les lames pendant 4 jours à l'obscurité pour les NSC et 7 jours pour la PT.

C. Quantification

L'analyse quantitative des autoradiogrammes est effectuée à l'aide d'un analyseur d'images (Biocom, RAG 200). Ce système permet de mesurer la densité optique (DO) des structures cérébrales marquées et de la traduire en équivalent DPM grâce aux standards exposés simultanément aux coupes de cerveau. L'hybridation totale de la sonde ^{35}S -UTP est donc obtenue par une mesure de la DO dans les structures marquées, convertie en équivalent DPM par la courbe étalon. La valeur de l'hybridation spécifique (hybridation de la sonde AS sur les seuls ARNm d'intérêt) est obtenue en retranchant à l'hybridation totale, la valeur de l'hybridation non spécifique qui correspond à l'hybridation obtenue avec la sonde S. Les résultats obtenus sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ SEM (5 animaux par point) des niveaux d'expression des ARNm.

D. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été divisée en deux parties : des analyses de variance ont permis de déterminer si l'expression du gène était rythmique. Ensuite, dans le cas où un rythme journalier serait présent, des régressions non linéaires des profils d'expressions ont été réalisées. Celles-ci ont permis de quantifier les effets de la pinéalectomie ou de l'injection de mélatonine selon différents critères : l'amplitude du rythme, la relation de phase du rythme

(temps de demi-montée, temps de demi-descente, l'amplitude, etc..), ou encore la durée du pic d'expression des ARNm. Dans tous les cas, un effet est considéré comme significatif si $p < 0.05$.

1. Analyse de variance (ANOVA)

Les analyses de variance ont été réalisées à l'aide du logiciel MINITAB®. Une ANOVA à un facteur (facteur horaire) est effectuée pour déterminer si le profil des ARNm présente un rythme journalier d'expression des ARNm. Ensuite une seconde ANOVA à 2 facteurs (facteurs point horaire et groupe expérimental) est effectuée et l'étude de l'interaction point horaire/groupe expérimental a permis de déterminer si les profils d'expression des ARNm des gènes étudiés étaient affectés par la pinéalectomie.

2. Régressions non linéaires

L'ANOVA à deux facteurs permet de dire s'il existe un effet de la mélatonine (apport exogène ou privation par pinéalectomie) sur l'expression du gène, et il est possible de déterminer s'il existe des points statistiquement différents en faisant une analyse post-hoc. Cependant, l'analyse post-hoc ne donne aucune quantification précise des effets. C'est pourquoi j'ai eu recours à des régressions non linéaires des profils d'expression des ARNm, en utilisant ici le logiciel Sigmaplot®. Les profils d'expression ont été linéarisés en utilisant l'équation d'une courbe à un pic de logistique :

$$f = y_0 + (y_{\max} / ((1 + \exp(\text{slope1} * (\phi - x))) * (1 + \exp(\text{slope2}(x - \phi - m - d)))))$$

La régression permet de déterminer 4 valeurs :

- Le niveau minimal moyen de l'expression de l'ARNm (y_0).
- L'amplitude moyenne de l'expression de l'ARNm ($y_{\max}$).
- Le temps de demi-montée, qui correspond à l'heure où la présence d'ARNm atteint 50% de la valeur maximale initiale (ϕ).
- La durée du taux maximal des ARNm (d).

Ensuite une seconde régression non linéaire combinée à plusieurs groupes permet d'augmenter la puissance du test puisque la régression est réalisée à partir de l'ensemble des données. Cette régression est calculée avec l'équation :

$$f = y_0((y_{\max} + a) / ((1 + \exp(\text{slope1} * (\phi - x + m))) * (1 + \exp(\text{slope2}(x - \phi - v - d)))))$$

et elle permet de déterminer 3 valeurs :

- La différence d'amplitude entre les deux groupes (a).
- L'avance ou le retard de phase au temps de demi-montée (m).
- La différence de durée du taux maximal des ARNm (v).

VII. Dosage radioimmunologique

A. Principe

Les concentrations en mélatonine dans les plasmas sont déterminées par un dosage radioimmunologique spécifique. Cette méthode est basée sur la compétition d'un ligand « froid » et du même ligand radioactif marqué à l'iode 125 sur un anticorps spécifique. Une fois que l'équilibre de fixation sur l'anticorps est atteint, on isole la fraction liée à l'anticorps. La radioactivité (de type gamma) est ensuite quantifiée, et en référence à une gamme étalon, les concentrations en mélatonine présentes dans les plasmas ou broyats tissulaires, sont facilement mesurées.

B. Protocole

1. Extraction de la mélatonine

La mélatonine est extraite à partir de 500 µl de plasma ou à partir de broyat tissulaire. Dans le cas du broyat tissulaire, des échantillons de tissus sont pesés, puis 100 mg environ sont broyés dans 2 ml de tricine sur un lit de glace (afin que la température n'augmente pas trop et ne dégrade pas la mélatonine). Ce mélange est ensuite centrifugé pendant 10 min à 4°C à 2000 rpm, et le surnageant est récupéré (environ 1.5 ml) et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Dans les deux cas (plasma et broyat tissulaire), la mélatonine est ensuite extraite par 5 ml de dichlorométhane (DCM). Cette phase hydrophobe est récupérée puis évaporée. Le culot ainsi obtenu est redissout dans la tricine et la mélatonine y est dosée. Après l'extraction, les échantillons issus des animaux ayant été injectés à la mélatonine, seront dilués au dixième ou au centième afin que les valeurs obtenues soient comprises dans la gamme étalon.

2. Dosage de la mélatonine

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

1/2500000. Cet anticorps est mis à volume égal, en présence de 100 µl d'échantillon et de 300 µl de mélatonine marquée (13000 cpm/300 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.

RESULTATS



Dans l'article suivant, pour caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de la mélatonine exogène sur les NSC, j'ai étudié les effets d'une injection unique de mélatonine sur les patrons d'expression des ARNm des différents récepteurs orphelins. Pour la première fois, plusieurs effets rapides de la mélatonine ont été observés dans les NSC. Le premier concerne *rorβ*. En effet, dans l'heure qui suit l'injection de mélatonine, une prévention transitoire de la diminution du niveau minimum d'expression de *rorβ* est observée dans les NSC. Mais surtout, la mélatonine provoque une avance de phase d'environ 1.3 h du rythme d'expression de *rev-erba* dès la première nuit suivant l'injection. Ce déphasage montre que *rev-erba* pourrait être un effecteur rapide des effets de la mélatonine sur les NSC. Par ailleurs, en suivant les patrons d'expression des ARNm de *bmal1*, un gène dont l'expression est sous le contrôle de *rev-erba* et qui est également le partenaire activateur essentiel de l'horloge moléculaire, nous avons observé une avance de phase significative de 1.8 h le jour circadien suivant. Nous pouvons donc fortement suggérer une relation de causalité entre les effets de la mélatonine sur l'avance de phase de l'expression de *rev-erba*, et l'avance de phase de l'expression de *bmal1* au cours du cycle circadien suivant puisque la protéine REV-ERB α , est un puissant modulateur de l'expression de *bmal1*.

I. Les effets d'une injection de mélatonine dans les NSC

A. Abstract

B. Introduction:

C. Experimental procedures

1. Animals

2. **Melatonin levels**
3. ***In situ* hybridization**
4. **Statistical analysis**

D. Results

E. Discussion

F. Conclusion

G. Acknowledgements

H. References

Les NSC et la PT sont 2 structures privilégiées pour caractériser et étudier la transduction des messages circadiens et saisonniers véhiculés par la mélatonine. Nous venons de voir qu'il existe un lien entre les récepteurs orphelins et la mélatonine exogène dans les NSC. Il a été donc intéressant de voir si un tel lien pouvait exister entre la mélatonine endogène et les récepteurs orphelins dans les NSC. De même, de récents résultats montrent un lien direct entre la mélatonine et les gènes horloges dans la PT (Vongall et al., 2005). Il était donc également intéressant d'étudier les conséquences d'une suppression de mélatonine circulante sur l'expression de ces deux gènes dans la PT. L'absence de mélatonine par pinéalectomie n'a pas de conséquence sur l'expression de *rorβ* et *rev-erbα* dans les NSC même après une très longue absence de l'hormone. En revanche, dans la PT, une perte de rythmicité de l'expression de ces 2 gènes ainsi qu'une forte diminution de leur niveau d'ARNm est observée. Une administration de mélatonine dans l'eau de boisson, permettant de mimer les variations journalières de mélatonine après pinéalectomie, prévient la perte du rythme circadien et le niveau d'expression des ARNm de *rorβ* et *rev-erbα* dans la PT. Ces résultats montrent que la mélatonine n'est pas nécessaire à la conservation de l'amplitude ou la réinitialisation la rythmicité circadienne des NSC mais également que l'expression de *rorβ* et *rev-erbα* est spécifiquement contrôlée dans la PT par les variations circadiennes de la mélatonine. Cependant, la préservation du rythme d'expression des deux récepteurs orphelins n'est que partielle et cela suggère que la mélatonine n'est pas le seul facteur impliqué. Cette régulation différenciée de l'expression des 2 partenaires *rorβ* et *rev-erbα* dans la PT et dans les NSC, renforce l'intérêt de l'étude concomitante de ces deux structures pour étudier les effets de la mélatonine sur la régulation de la rythmicité biologique circadienne et saisonnière.

Longterme absence of melatonin affects orphan receptors and clock gene expression rhythms in the *Pars Tuberalis* but not in the SCN.

L. Agez, V. Laurent, H. Guerrero, P. Pévet, M. Masson-Pévet and F. Gauer

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives - Département de Neurobiologie des Rythmes, CNRS UMR 7168-LC2, IFR 37 Neurosciences - Université Louis Pasteur – 5, rue Blaise Pascal - F-67084 Strasbourg.

Corresponding author :

Prof F. Gauer
INCI, Département de Neurobiologie des Rythmes,
CNRS UMR 7168 - LC2,
Université Louis Pasteur
5, rue Blaise Pascal
F-67084 Strasbourg
-France-
Tel : +33 (0)3 88 45 66 88
Fax : +33 (0)3 88 45 66 54
gauer@neurochem.u-strasbg.fr

Key words : SCN, PT, HIS, *rev-erba*, *rorβ*, pinealectomy

List of abbreviations:

ISH	<i>In situ</i> Hybridization
NECA	5' N Ethyl Carboxamid Adenosine
NOR	Nuclear Orphan Receptors
PT	<i>Pars tuberalis</i>
ROR	Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor
RORE	Retinoic acid receptor-related Orphan receptor Response Element
SCN	Suprachiasmatic Nuclei
TF	Transcription Factor

II. Les effets de la pinéalectomie dans les NSC et la PT

A. Abstract

The suprachiasmatic nuclei (SCN), the master mammalian circadian clock distribute the circadian nervous message to the pineal gland which transform it to an humoral circadian and seasonal message: the nocturnal melatonin synthesis, that modulates tissues which express melatonin receptors as the SCN. Nuclear orphan receptors (NOR), have been presented as functional links between the regulatory positive and negative loops of the molecular clock, and can activate ($ROR\alpha$) or repress ($REV-ERB\alpha$) *bmal1* expression. Recently, a single melatonin injection was shown to phase-shift the *rev-erba* circadian rhythm in the SCN. These results clearly suggested that these NOR could be the initial targets of the melatonin chronobiotic message within the SCN. In this study, we investigate the role of these NOR in the physiologic effect of melatonin on these tissues. We monitored *rorβ* and *rev-erba* mRNA expression levels by quantitative *in situ* hybridization after pinealectomy. Pinealectomy was shown to have no consequence on the NOR circadian expression rhythms in the SCN in 8 days pinealectomized animals as well as in 3 months pinealectomized animals. These results clearly establish that the endogenous melatonin does not control neither sustain the well known circadian pattern of the clock genes and NOR in the SCN circadian clock. On the opposite pinealectomized animals display no rhythmic expression of NOR mRNA accompanied with a drastic decrease of their level, in the *pars tuberalis* (PT). Moreover, daily melatonin administration in drinking water could restore the *rev-erba* and *rorβ* circadian expression rhythm and partially their level in the PT. These results pointed out that NOR can be regulated by the melatonin circadian rhythm, in the PT, and could be the link between the physiological action of melatonin and the core of the molecular circadian clock in this tissue.

B. Introduction

The secretion of the pineal hormone melatonin is well known to be under the control of the circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus [1-4], melatonin being an outgoing message which provides both circadian and seasonal information. In the central nervous system, tissues expressing elevated levels of high affinity melatonin receptors are the SCN and the *pars tuberalis* (PT). The physiological significance of these melatonin receptors in the two structures have been widely explored. In the PT, a thin

sheath of tissue surrounding the mammalian pituitary stalk, melatonin is strongly implicated in the photoperiodic regulation of prolactin secretion and because of its high density of melatonin receptors, has become a key model tissue for the understanding of melatonin signal readout [5-10]. However, although the implication of melatonin in the regulation of seasonal functions has been extensively documented [for reviews 11-13], the role of its physiological feedback action on the mammalian circadian system still remains unclarified. Melatonin receptors are also highly expressed within the SCN, and are then one of the strongest arguments for a biological role of endogenous melatonin on the circadian system [14-15]. Nevertheless, even non physiological, other melatonin actions have been observed on the SCN as a phase shift of the locomotor activity rhythm induced by a single melatonin injection at 1 mg/kg at CT 11.5. These melatonin effects are considered as chronobiotic. Furthermore, even if they are not directly interpretable in terms of animal physiology, they are supposed to be mediated through the high affinity melatonin receptors [11, 15-17]. However, the melatonin receptor subtype potentially involved in the expression of these chronobiotic effects remains unclarified. Over the past few years, then, we focused our investigations on the molecular mechanisms underlying these effects of exogenous melatonin on the SCN rhythmicity.

The molecular basis of the SCN circadian mechanisms have been established by the identification of clock genes. Transcription factors (TF) interact in positive transcriptional/posttranslational regulatory loops *via* CLOCK and BMAL1 that activate clock genes expression like *per* and *cry* and negative loops *via* PER and CRY that repress the CLOCK-BMAL1 stimulation transcription on their own genes [18-20]. These regulatory loops constitute the molecular basis of the circadian oscillation. The variations of the mRNA and proteins expression level are thus reliable witnesses of the circadian time and could be used to quantify the melatonin effects on the master circadian clock. The conducted investigations led us to the evidence that clock genes are not the initial melatonin responsive elements, but the nuclear orphan receptor (NOR) *rev-erba* and *rorβ* [21-22]. Indeed, recently, novel genes belonging to the NOR family, have been involved in the molecular endogenous clock. The TF REV-ERBα was shown to inhibit *bmal1* transcription *via* three independent RORE sequences (ROR response element), while BMAL1 enhances *rev-erba* expression through the well known *e-box* sequence, located upstream the gene promoter [23]. The orphan nuclear receptor REV-ERBα inhibits the positive loop and provides molecular basis for a

negative feed-back within the positive loop. Other TF of the NOR family, ROR α and ROR β may be implicated in the modulation of the clock. While both of them display mRNA transcription circadian rhythm within the SCN, ROR α is known to activate *bmal1* transcription through the RORE sequences [24-25]. ROR α and ROR β may compete with REV-ERB α to bind to the RORE sequences of the *bmal1* promoter [24-25]. Previous results showed that a unique melatonin injection at CT 11.5 induces a 90 minutes phase-advance of the *rev-erba* mRNA expression rhythm in the SCN and prevents the *ror β* normally observed low expression levels in the early circadian night following the injection [22]. For the first time we could thus identify SCN circadian machinery components directly responsive to melatonin SCN stimulation. We therefore designed experiments to investigate whether these early effectors of the melatonin chronobiotic action on the SCN machinery might also be implicated in the putative physiological melatonin feed back on the SCN. Therefore we investigated this potential link by suppressing the major source of the circulating melatonin: the pineal gland, comparing short (8 days) vs long absence (3 months) of the hormone on the rhythms of the NOR and clock genes expression in the SCN. Clock genes are also present in the PT and it is now clear that melatonin is a key regulator of clock genes expressions in the mammalian PT. Indeed, clocks genes expression patterns were modified by modulation of the endogenous profile of melatonin secretion, by manipulation of ambient photoperiod or administration of exogenous melatonin, [26-33]. In this study, we studied and compared the effect of the lack of melatonin on clock genes and NOR in the SCN and the PT, two main target sites of the hormone.

C. Experimental procedures

1. Animals

All experiments were performed in accordance with the "Principles of laboratory animal care" (National Institutes of Health publication no. 86-23, revised 1985) and with the French national laws. All efforts were made to minimize animal suffering and to use the minimal number of animals. Young adult Wistar male rats (200–250 g, Janvier, France) were kept from birth in a 12 hours light/12 hours dark regimen. Food and water were provided *ad libitum*.

2. Pinelectomy

The surgical operations were performed during the light period, at least 2 weeks after transport of the animals into our laboratory. Two groups were made, a group of pinealectomized animals and a sham-operated group. Pinealectomy were done under Rompun/Zoletil anaesthesia (0,01 mg/g of body weight and 0,04 mg/g of body weight respectively). After being placed into a stereotaxic instrument, a cranial incision was made onto the pineal gland area. The pineal was removed with fine forceps and the incision closed. Animals who received the sham pinealectomy procedure underwent the identical procedure excepted the pineal gland was not removed.

Sacrifices were performed 8 days or 3 months after completion of the surgery. The animals were transferred to constant darkness (a dim red light was kept permanently on throughout the 24 hours period) for two days prior sacrifice. The animals were then sacrificed by decapitation at different time points throughout 24 hours. The time-points of the sacrifices are mentioned within the result section. For each experimental time point, 5 animals were used. Brains were rapidly dissected out, frozen on dry ice and maintained at -20°C until sectioning. Serial coronal sections (20 µm thickness) of the brain region containing the SCN and the PT were cut on a cryostat, mounted onto gelatine-coated slides and then kept at -20°C until being processed for the quantification of mRNA expression by *in situ* hybridization.

3. Melatonin

Half of the pinealectomized animals were provided with melatonin into the water from the day of the surgery. One ml of a 7.5 mg/ml melatonin solution was added to 500 ml of current water and changed twice a week. This protocol represent an efficient way to restore the blood rhythm melatonin [11, 34-35].

Trunk blood was collected in heparinized tubes. Plasma melatonin concentrations were measured in duplicate by radio immunoassay (RIA) using 2-[¹²⁵I] melatonin and a rabbit antiserum (R19540, INRA Nouzilly, France) at a final dilution of 1:250000. The minimum detection levels for the assay were between 5 and 10 pg/ml plasma. Validation of the RIA assay has been reported previously [36].

4. *In situ* hybridization

The *rev-erba*, *rora* and *rorβ* probes for *in situ* hybridization were synthesized from the followed nucleotide sequences available on GenBank : *Rattus norvegicus rev-erba* : NM_145775 nucleotides 908-1890, *Mus musculus rorβ* : XM_129222 nucleotides 980-1742, *Mus musculus bmal1* : AB_012601 nucleotides 55-1807. The *Rattus norvegicus* sequence of *Per1* (981 bp) and *Per2* (760 bp) partial cDNA clones were kindly donated by Professor H. Okamura (Department of Anatomy and Brain Science, Kobe University School of Medicine, Japan). In order to quantify mRNA expression in the SCN, antisense probes were transcribed: 1 µg of linearized plasmid was transcribed for 2 hours at 37°C with 4 µl of transcription buffer; 10 mM of ATP; 0,5 mM of CTP; 0,5 mM of GTP; 12,5 µM of UTP; 50 µCi of α³⁵S-UTP (Amersham, Saclay, France) (specific activity: 1200 Ci/mmol); 20 mM of dithiothreitol; 25 units of the corresponding RNA polymerase (T3, T7 or SP6), and diethyl pyrocarbonate-treated water to get a final volume of 20 µl according to the manufacturer's protocol (MAXI script, Ambion Inc., Austin, TX, USA). Briefly, sections were fixed in 4 % formaldehyde for 10 min. They were acetylated in 0.5 % acetic anhydride, and in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0) for 10 min. The slices were then incubated in 0.1 M Tris (pH 7.0) with 0.1 M glycine for 30 min. They were rinsed and dehydrated in a graded ethanol series (70, 90, 95 and 100 %, 1 min each), and finally, air-dried. Hybridization was carried out with antisense radiolabeled probe (2,5×10⁵ cpm per ml of hybridization medium for each probe) in a solution containing 50 % deionised formamide, 10 % dextran sulfate, 50 mM dithiothreitol, 1× Denhardt's solution, 2× SSC, 1 mg/ml salmon sperm DNA, 1 mg/ml yeast RNA, at 54°C for 16 hours. In the following step, the sections were washed twice for 10 min in 2× SSC before being treated with Ribonuclease A for 30 min at 37°C (Sigma, St. Quentin Fallavier, France 2 µg/µl). The slides were then rinsed twice and stringency washes were carried out (2×10 min in 4x SSC RT, 2×10 min in 2x SSC RT, 15 min in 0.5x SSC at 53°C and then 30 min in 0.2x SSC at 62°C). Finally, the sections were dehydrated in a graded ethanol series (70, 90, 95 and 100 %, 1 min each) and air-dried. The slides were exposed to an X-Ray film (BioMax, Kodak, France) for 5 days. Quantitative analysis of the autoradiograms was performed as previously described [15,37]. The specificity of the hybridization were assessed by the use of sense probes [22].

5. Statistical analysis

Each experimental time point is the mean $\pm$ SEM of 5 animals. A one-way analysis of variance (ANOVA) with time as a factor was, first of all, performed using Minitab software (Minitab Inc., State College, PA, USA) to check whether the mRNA expression pattern obtained for each gene at different time-points were time-dependent. If so, the data were fitted by non-linear least-squares regression (SigmaPlot, Chicago, IL) to a logistic peak with the following equation:

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

f = mRNA level

y_0 = basal level

$y_{\max}$ = peak amplitude (above basal)

slope_1 = ascending slope

slope_2 = descending slope

ϕ = time of half amplitude on increase

d = duration of the peak (delay between times of half amplitude on increase and decrease).

The slope curves were determined from regression on a first-trial run, and then set at constant values throughout the whole analysis. The effects of melatonin were then assessed by a variance–covariance analysis (ANCOVA) in which the following parameters were introduced stepwise depending on F -to-enter :

a = difference in amplitude

m = phase advance or delay for the time of half increase

Once the parameters were added, the final equations were :

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

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

The corresponding analysis of variance was followed by F -test to determine whether the mRNA profiles of animals injected with vehicle or melatonin were statistically different. The threshold to accept the hypothesis that melatonin had an effect was set to 0.05.

D. Results

In the sham operated animals, concentration of plasma melatonin followed the well known circadian rhythm with high levels during the subjective night, and low levels during the subjective day. Pinealectomized animals did not display plasma melatonin rhythm with very low values throughout the whole circadian period (Fig. 1A). Animals supplemented in melatonin displayed a melatonin circadian rhythm. As for the control group, the higher values were observed during the subjective night with a maximum and the lower values during the subjective day. However, the values observed in the plasma for the supplemented melatonin group were ten fold higher than those of control animals (Fig. 1B) .

Representative *in situ* hybridizations of rat coronal brain sections hybridized with cRNA riboprobes are presented for each gene and tissue (Fig. 2G and 5G). In a first experiment, the animals were sacrificed 8 days after the pinealectomy. The mRNA expression pattern for *rorβ*, *rev-erba* and *per1* presented strong circadian variations in the control groups (Fig. 2 and 5). However, the main characteristics of the mRNA expression patterns in the SCN (Fig. 2) and in the PT (Fig. 5) were differentially affected by the pinealectomy.

1. Effect of pinealectomy in the SCN

In the SCN of the control animals, the maximal *rev-erba* mRNA expression was reached in the middle of the subjective day (CT 05) and displayed its lowest values during the subjective night (CT 14) (Fig. 2A). The *rorβ* mRNA expression in the SCN of control rats displayed a twenty four hour rhythm with maximal values observed at the mid of the subjective day (CT 09) and the lowest values during the subjective night (CT 14) (Fig. 2C). The maximal *per1* mRNA expression was reached in the middle of the subjective day (CT 07) and displayed the lowest values during the subjective night (CT 14) in the SCN in control animals (Fig. 2E). The regression of the three curves is shown on figure 2B, 2D and 2F. After pinealectomy, the data analysis revealed that the surgery did not induce any changes in the *rev-erba*, *rorβ* or *per1* mRNA expression level rhythms. Indeed, neither the phase nor the amplitude were modified by the pineal gland removal ($p > 0.05$) (Fig. 2B, 2D and 2F). In order to know if a prolonged absence of the circadian rhythm of melatonin has an effect on the amplitude of molecular oscillations in the SCN, a second experiment was performed in which, the animals were sacrificed 3 months after the pinealectomy. As showed on figures 3 and 4,

the main characteristics (amplitude, phase) of all the expression patterns of the studied genes were not modified in response to the absence of plasmatic melatonin ($p > 0.05$).

2. Effect of pinealectomy in the PT

The maximal *rev-erba* mRNA expression was reached in the first hours of the subjective day (CT 02) and displayed its lowest values during the subjective night (CT 18) in the PT of control animals (Fig. 5A). The *rorβ* mRNA expression in the PT of control rats displayed a twenty four hours rhythm with maximal values observed at the beginning of the subjective day (CT 02) and the lowest values during the subjective night (CT 14) (Fig. 5C). The maximal *per1* mRNA expression was reached at the end of the subjective day (CT 09) and displayed its lowest values during the subjective night (CT 22) in the PT of the control animals (Fig. 5F). The regression of the three curves are shown on figure 5B, 5D and 5F. Data analysis revealed that *rev-erba*, *rorβ* and *per1* mRNA expression rhythms were completely abolished in pinealectomized animals ($p < 0.05$). Moreover, the mRNA expression rhythms of the pinealectomized animals were constantly lower than control animals ($p < 0.05$) (Fig. 5B, 5D, 5F). Addition of melatonin in the drinking water partially prevented the loss of the NOR mRNA expression rhythm. The data analysis did not reveal any modification of the phase of the mRNA expression pattern when the supplemented melatonin group was compared to the control groups ($p > 0.05$) (Fig. 5B and 5D). However, a significant decrease of the amplitude with values between the control group and the pinealectomized group was observed. Remarkably, addition of melatonin in the drinking water did not prevent the loss of *per1* mRNA which expression did not differ from that of pinealectomized animals.

E. Discussion

In recent studies, we worked at clarifying the molecular mechanisms underlying the chronobiotic effect of melatonin on the rat SCN. The conducted investigations led us to the evidence that the clock genes, the major actors of the positive and negative transcriptional feedback loops are not the initial melatonin responsive elements, but the nuclear orphan receptor (NOR) the *rev-erba* and *rorβ* [21, 22]. We therefore hypothesize that these links between the chronobiotic action of melatonin and the core of the circadian system might also be implicated in the endogenous melatonin action on the SCN. To test such an hypothesis, we

then investigated the *rev-erba* and *rorβ* mRNA expression patterns in 8 days absence of circulating melatonin.

The well known nocturnal plasma melatonin peak [38 Illnerova and Vanecek; for review : 39 Pevet, 1988] could be detected in the control animals while plasma melatonin level were under the detection limit in the pinealectomized animals. It must be noted that in this particular strand of Wistar rats, the endogenous melatonin peaks extremely late (Fig. 1A) during the night [40]. In a third group, rats were pinealectomized and daily supplemented with melatonin in the drinking water, a protocol known to synchronize free-running activity in rats and restore a melatonin blood concentration rhythm [34, 35, 41]. These animals supplemented with melatonin displayed circadian variations with high and low levels during the subjective night and day, respectively. However, the plasma values were higher than those observed in the control group.

As previously shown, *rorβ*, *rev-erba* and *perl* exhibited strong circadian variations in the SCN [42-44] as well as in the PT [31, 32]. However, these SCN and PT expression patterns were dramatically differentially influenced by the pinealectomy. Indeed, while in the SCN, the surgical removal of plasma melatonin did not induce any change of the NOR and *perl* expression pattern, the levels of expression were almost abolished in the PT in the absence of the pineal gland.

In the SCN, the NOR mRNA circadian expression patterns are then obviously not under the control of the endogenous melatonin secretion pattern, as they remain absolutely unmodified after pinealectomy. Thus, they just behave as *bmal1*, *per2* and *perl* which patterns were unmodified by suppression of the endogenous melatonin by pinealectomy or constant light or remain insensitive to *mt1* or *mt2* melatonin receptors invalidation [30, 32]. Therefore, these mRNA expression patterns are not a key element relaying endogenous melatonin information within the SCN core which send us back to the initial question: what is the significance of a melatonin feed-back on the SCN ? One of the major objections could then only provide to the SCN a circadian time information already generated within the clock. Thus, the SCN would have no need of this putative redundant circadian information to express their own rhythmicity. However, classical physiological feedback loops are generally acting more on the amplitude of the controlled parameter than on the time-phase. It has then been proposed that the particular function of the melatonin on the SCN circadian clock might be to sustain the amplitude of the SCN circadian oscillation. Already in 1990, Cassone suggested that melatonin secreted every night could be involved in the amplitude of oscillations in the SCN [45]. We postulated that longer time without melatonin is necessary to

observed a decrease of the amplitude of the clock gene expression rhythm. We therefore investigated whether longer pinealectomy period would influence the amplitude of the molecular partners within the SCN core machinery. Animals were kept under standard lighting conditions for three months after the removal of the pineal gland. After such a long period, we could observe that chronic melatonin deprivation had no consequence on the *NOR*, *ror β* , *rev-erba* and the clock genes *per1*, *per2* and *bmal1* mRNA rhythms expression in the SCN. These results clearly establish that the endogenous melatonin does not control neither sustain the well known circadian pattern of the clock genes and NOR in the SCN circadian clock.

In contrast, in the PT, pinealectomy abolishes the circadian expression rhythms of the NOR genes as it does for other clock genes such as *per1*. It has been known for many years that in the PT, the melatonin secretion pattern leads 1) circadian responses such as the melatonin receptor density rhythm demonstrated to be directly driven by melatonin independently of the SCN or the LD cycle [46], as well as 2) seasonal responses such as the photoperiodic changes in the expression of melatonin binding sites [47, 48]. However, the PT integration mechanisms of the melatonin message are still unclarified. At first glance, the above mentioned NOR and clock genes are implicated in the circadian machinery of the SCN. If the promoting sequences activated in the PT leading their transcriptional expression, are the same as in the SCN, the well known negative and positive molecular loops should exhibit the same self sustained oscillation. The present results and previous ones absolutely contradict this suggestion [30]. Indeed, the first information that one might take out of these results, is that the NOR and clock genes expression are not self sustained in the PT underlying the major differences between a true oscillator (self sustained) and a peripheral oscillator (such as pineal gland, liver, PT, etc where oscillations damp with time) [49]. Then, the main challenge is to clarify the role of the melatonin in sustaining the NOR and clock genes circadian oscillation within the PT. Three different hypothesis will be here discussed. 1) First of all, the gene transcription may display a self-supported mRNA expression rhythm, but melatonin would be a pre requisite (by inhibiting a strong inhibitor, or by acting as a general activator) for these circadian loops to function. No obvious argument could support (or invalidate) this hypothesis for the moment. 2) Melatonin, as a true circadian message directly controls the daily expression of all these loops. PT would then not be a real oscillator, but a driven system responding passively to the melatonin daily rhythm. Several arguments could strengthen such an hypothesis. Indeed, in a previous study using an acute injection paradigm, we had observed

that *cry1* was strongly but transiently induced by melatonin, independently of the administration time [29, 30]. Furthermore, in control animals, the *cry1* expression peak is concomitant with high plasma melatonin levels. Therefore, the melatonin nocturnal signal could be the daily initial event of the periodic revolution of the NOR and clock genes expression patterns in the PT. However, after one day with low plasma levels due to constant light application, the clock genes and *rev-erba* mRNA expression rhythms have not disappeared yet [30]

3) The PT as a peripheral oscillator, possesses all the fundamental elements (clock genes) to generate a circadian oscillation, but as other peripheral oscillators, these oscillation damp within a couple of days [30], in free running conditions (e.g. *in vitro* conditions). Melatonin initial action on the PT would be to both daily reset and entrain this time generating the molecular loops. Despite this circadian time provider, endogenous melatonin might also directly modulate the circadian expression of the clock genes, as mentioned above for *cry1*. In contrast, *per1* expression is not directly responsive to acute melatonin, but appears to be in phase with the offset of melatonin secretion. This dual effect of melatonin on 2 clock genes partners has been proposed to be a key element in understanding how the photoperiodic-dependant pattern of the melatonin secretion is integrated by the PT [29, 50, 51].

We also observed that the melatonin supplementation prevents the loss of the NOR expression rhythms but not that of *per1*. However, the prevention is not complete and we can observe an expression rhythm but the amplitude is weaker. As seen on figure 1, melatonin day values of the supplementary group are higher than the nocturnal one observed in control animals. Therefore, even if the melatonin provided through the drinking water restore circadian variations in circulating melatonin levels, the melatonin binding sites might almost be saturated along the 24 hours period, making the PT insensitive to the circadian melatonin oscillation. In such an hypothesis, the partial recovery of the circadian oscillations of the NOR and clock genes, would be explained as a partial dampening of the circadian rhythmicity due to a weaker day versus night melatonin message. However, melatonin is certainly not the only modulator on the clock genes in the PT. This hypothesis is supported by several precedent results. Indeed, in previous studies, pinealectomy was shown to abolish the *per1* mRNA circadian rhythm in the PT [31]. The authors also showed that even after daily melatonin injection at 1 mg/kg, the *per1* expression rhythm was only partially prevented and suggested the existence of an other partner implicated in the clock gene expression in the PT. A relationship between melatonin and adenosine has been evoked by VonGall and collaborators

for the *per1* expression rhythm in the PT. Indeed, daily administrations of the A2b adenosine receptor agonist NECA during 6 days in pinealectomized Siberian hamster prevent the loss of PER1 expression rhythm and higher PER1 level is observed in PT slices when melatonin and NECA are co-applied. [31]. Actually, both adenosine and melatonin could act through an AMPc pathway as the A2b adenosine receptor is positively coupled to the adenylate cyclase and as the melatonin receptor is known to induce sensitivity of the AMPc signalling [31, 53-56]. Melatonin could control this AMPc pathway through the MT1 which is highly expressed in the PT [57]. Melatonin could also act on the PT cell machinery through the calcium signaling pathway [6] known to activate, *via* histone desacetylase phosphorylation [58], the *ror* transcription factors whose link with melatonin were previously described in the pineal gland [59, 60] and the SCN [22].

In conclusion, our present data clearly establish that neither *rorβ* nor *rev-erba* are directly involved in the mediation of the melatonin physiological effect on the SCN circadian clock. Furthermore, the melatonin physiological action on the SCN does not sustain the circadian rhythmicity on a long term basis. On the other hand, one of its demonstrated circadian role is clearly to support and even to induce the circadian rhythmicity within the PT. These tissue differential integrations of the melatonin message highlight the importance of investigating the molecular mechanism implicated in the melatonin message integration in both the PT and the SCN concomitantly.

F. Acknowledgements

Authors thank Prof. H. Okamura for the gift of *rper1* and *rper2* cDNA clones. We wish to thank also Dr. André Malan and Benjamin Tournier for their statistics expertise and Dr. Irina Riadnova, Daniel Bonn and Aurore Sensor for their excellent technical assistance.

G. References

- 1 Rusak B, Zucker I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* 1979; 59:449-526.
- 2 Ralph MR, Foster RG, Davis FC et al. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* 1990; 247:975-978.
- 3 Kalsbeek A, Buijs RM. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 2002; 309:109-118.
- 4 Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 1993; 49:654-664.
- 5 Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 1987; 435:359-362.
- 6 Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998; 78: 687-721.
- 7 Masson-Pevet M, Gauer F. Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals.* 1994; 3: 63-70.
- 8 VonGall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002; 309 151-162.
- 9 Lincoln GA, Clarke IJ. 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.* 1994; 6:251-260.
- 10 Morgan PJ. The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *J Neuroendocrinol.* 2000; 12: 287-295.
- 11 Pevet P, Bothorel B, Slotten H et al. The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res.* 2002; 309:183-191
- 12 Malpaux B, Tricoire H, Mailliet F et al. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl.* 2002; 59:167-179.
- 13 Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001; 16:336-347.
- 14 Poirel VJ, Masson-Pevet M, Pevet P et al. MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 2002; 946:64-71.
- 15 Pevet P, Agez L, Bothorel B et al. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int.* 2006; 23:39-51.
- 16 Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI. Selective MT2

melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.* 1998; 12:1211-1220.

17 Dubocovich ML, Hudson RL, Sumaya IC, Masana MI, Manna E. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res.* 2005; 39:113-120.

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

19 Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH. Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol.* 2003; 15: 329-334.

20 Hirota T, Fukada Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci.* 2004; 21:359-368.

21 Poirel VJ, Boggio V, Dardente H et al. Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience.* 2003; 120:745-755.

22 Agez L, Laurent V, Pevet P et al. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience.* 2007; 144:522-530.

23 Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell.* 2002; 110:251-260.

24 Sato TK, Panda S, Miraglia LJ et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 2004; 43:527-537.

25 Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12:441-448.

26 Hazlerigg DG, Morgan PJ, Messenger S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? *J Biol Rhythms.* 2001; 16:326-335.

27 Jilg A, Moek J, Weaver DR et al. Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur J Neurosci.* 2005; 22:2845-2854.

28 Messenger S, Garabette ML, Hastings MH, Hazlerigg DG. Tissue-specific abolition of Per1 expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport.* 2001; 12:579-582.

29 Dardente H, Menet JS, Poirel VJ et al. Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 114:101-106.

30 Johnston JD, Tournier BB, Andersson H, et al. Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology.* 2006; 147:959-965.

- 31 VonGall C, Garabette ML, Kell CA et al. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci.* 2002; 5:234-238.
- 32 VonGall C, Weaver DR, Moek J et al. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1040:508-511
- 33 Messenger S, Garabette ML, Hastings MH et al. Tissue-specific abolition of *Per1* expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport.* 2001; 12:579-582.
- 34 Pitrosky B, Kirsch R, Malan A et al. Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am J Physiol.* 1999; 277:R812-828.
- 35 Sloten HA, Pitrosky B, Pevet P. Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 1999; 14:347-353.
- 36 Mauviard F, Pevet P, Forlot P. 5'-Methoxypsoralen enhances plasma melatonin concentrations in the male rat: non-noradrenergic-mediated stimulation and lack of effect in pinealectomized animals. *J Pineal Res.* 1991; 11:35-41.
- 37 Schuster C, Gauer F, Guerrero H et al. Photic regulation of *mt1* melatonin receptors in the Siberian hamster pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12:207-216.
- 38 Illnerova H, Vanecek J. Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of a year. *Neuroendocrinology.* 1980;31:321-6.
- 39 Pevet P. The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev.* 1988;28:443-58.
- 40 Barassin S, Saboureaux M, Kalsbeek A et al. Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res.* 1999; 27:193-201.
- 41 Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science.* 1983; 219:1089-1091.
- 42 Onishi H, Yamaguchi S, Yagita K et al. *Rev-erbalpha* gene expression in the mouse brain with special emphasis on its circadian profiles in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res.* 2002; 68:551-557.
- 43 Sumi Y, Yagita K, Yamaguchi S et al. Rhythmic expression of *ROR beta* mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 2002; 320:13-16.
- 44 Matsui D, Takekida S, Okamura H. Molecular oscillation of *per1* and *per2* genes in the rodent brain: an in situ hybridization and molecular biological study. *Kobe J Med Sci.* 2005; 51:85-93.

- 45 Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 1990; 13:457-464.
- 46 Gauer F, Masson-Pevet M, Stehle J, Pevet P. Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.* 1994; 641:92-98.
- 47 Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P. Differential regulation of melatonin receptors by short- versus long-term pinealectomy in the rat suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis. *J Pineal Res.* 1994; 16:73-76.
- 48 Dardente H, Poirel VJ, Klosen P et al. Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res.* 2002; 958:261-271.
- 49 Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science.* 2000; 288:682-685.
- 50 Hazlerigg DG, Morgan PJ, Messenger S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? *J Biol Rhythms.* 2001; 16:326-335.
- 51 Lincoln GA. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reprod Suppl.* 2002; 59:131-147.
- 52 Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol.* 1992; 6:384-393.
- 53 Stehle JH, Foulkes NS, Pevet P, et al. Developmental maturation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:706-716.
- 54 Godson C, Reppert SM. The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology.* 1997; 138:397-404.
- 55 Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. Physiological exposure to melatonin supsensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 1998; 139:3064-3071.
- 56 McNulty S, Ross AW, Barrett P et al. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol.* 1994; 6:523-532.
- 57 Klosen P, Bienvenu C, Demarteau O et al. The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:1647-1657.
- 58 Kane CD, Means AR. Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *EMBO J.* 2000; 19:691-701.

59 Baler R, Coon S, Klein DC. Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 220:975-978.

60 Brydon L, Roka F, Petit L et al. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 proteins. *Mol. Endocrinol.* 1999; 13:2025-2038.

H. Figures

1. Melatonin blood level

The quantification of blood melatonin levels during the subjective night and day, are presented for animals 8 days after sham-operation (●) (A), pinealectomy (■) (A) or pinealectomy with supplemented melatonin (▲) (B). The gray and white backgrounds indicate the subjective night and subjective day respectively. Each point is the mean $\pm$ S.E.M. of five animals (the CTs mentioned are the Circadian Time of sacrifice).

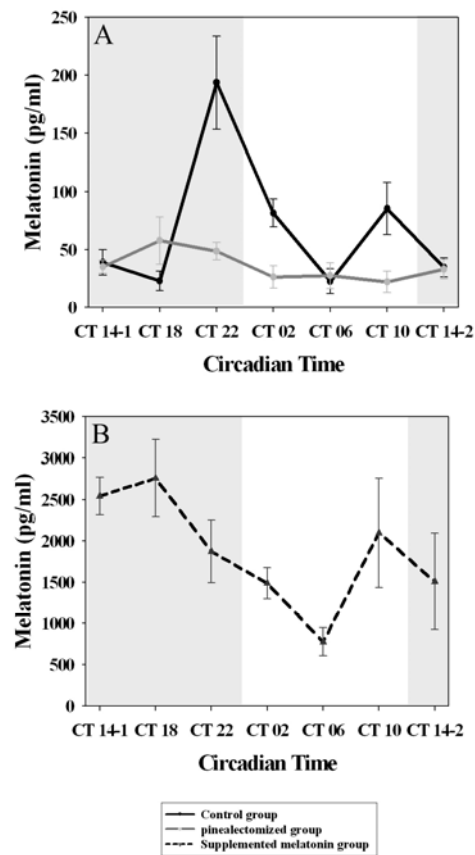
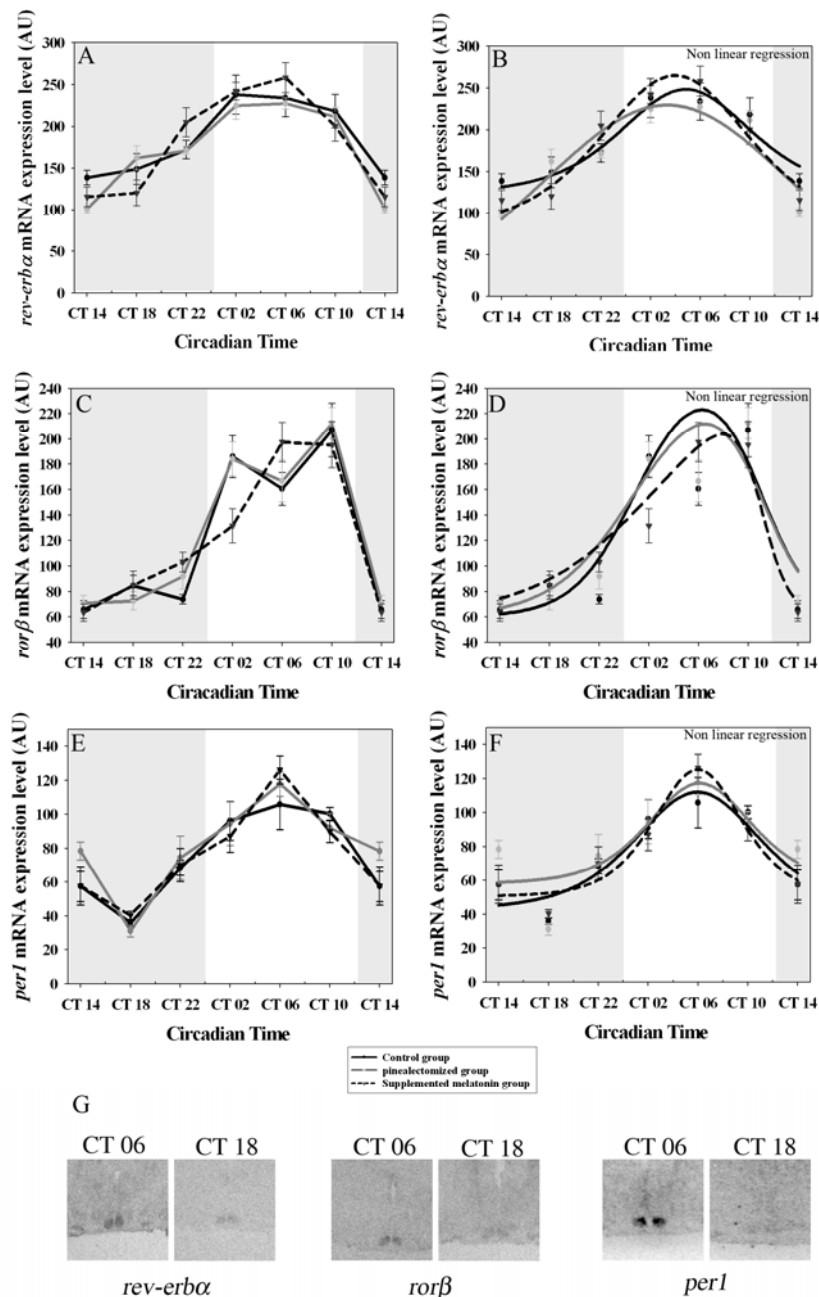


Figure 1.

2. *Rev-erba* *rorβ* and *per1* mRNA expression in the rat SCN

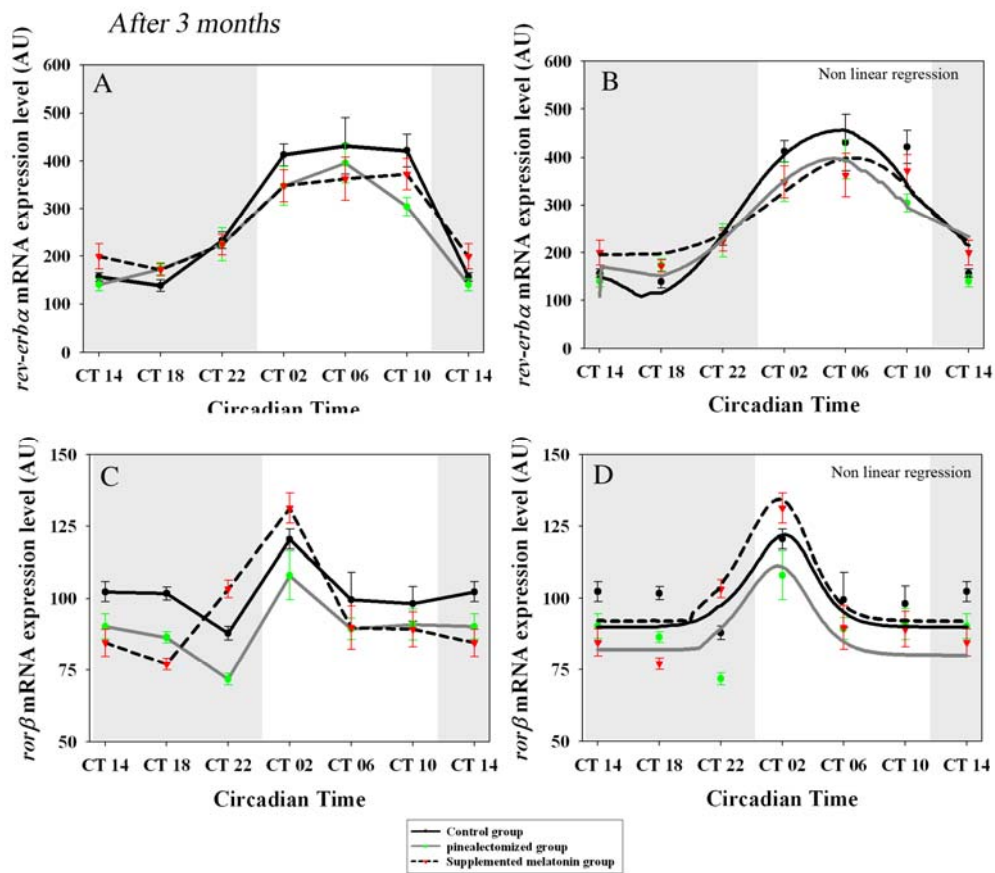
The quantification of the mRNA expression of *rev-erba* (A), *rorβ* (B) and *per1* (C) in arbitrary units (AU) and the non linear regression for mRNA level (D, E and F respectively) are presented for animals 8 days after pinealectomy (■), pinealectomy with supplemented melatonin (▼) or sham-operation (●). The gray and white backgrounds indicate the subjective night and subjective day respectively. Each point is the mean $\pm$ SEM of 5 animals.

The rat coronal brain sections hybridized with cRNA riboprobes are presented below the diagrams. SCN sections were hybridized with 35 S-labelled antisense cRNA riboprobe (G), the CTs mentioned are the Circadian Time of the animal killings.



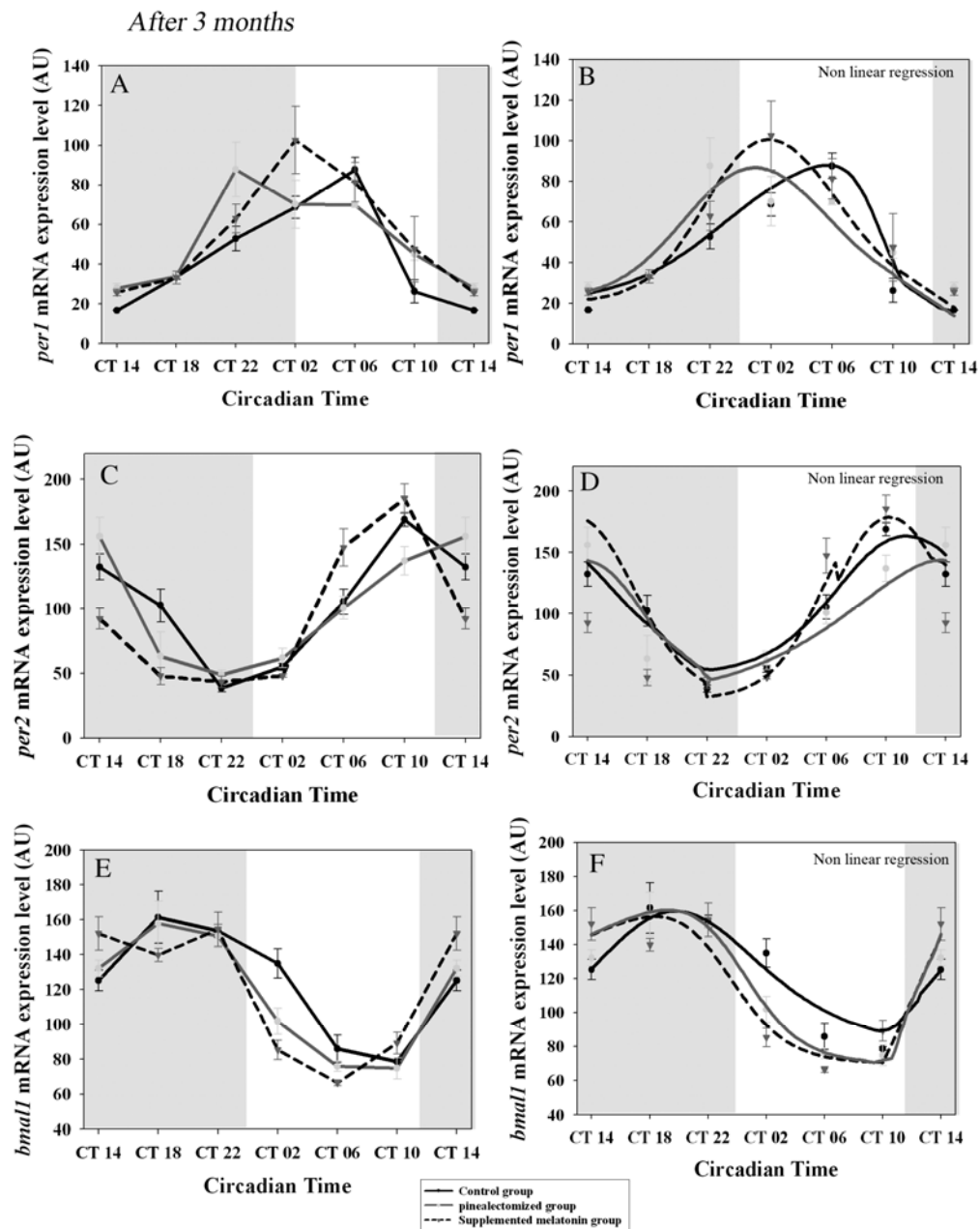
3. NOR mRNA expression in the SCN, 3 months after pinealectomy

The quantification of the mRNA expression of *rev-erba* (A) and *rorβ* (B) in arbitrary units (AU) and the non linear regression for mRNA level (C and D respectively) are presented for animals 3 months after pinealectomy (■), pinealectomy with supplemented melatonin (▼) or sham-operation (●). The gray and white backgrounds indicate the subjective night and subjective day respectively. Each point is the mean $\pm$ SEM of 5 animals and the CTs mentioned are the Circadian Time of sacrifice.



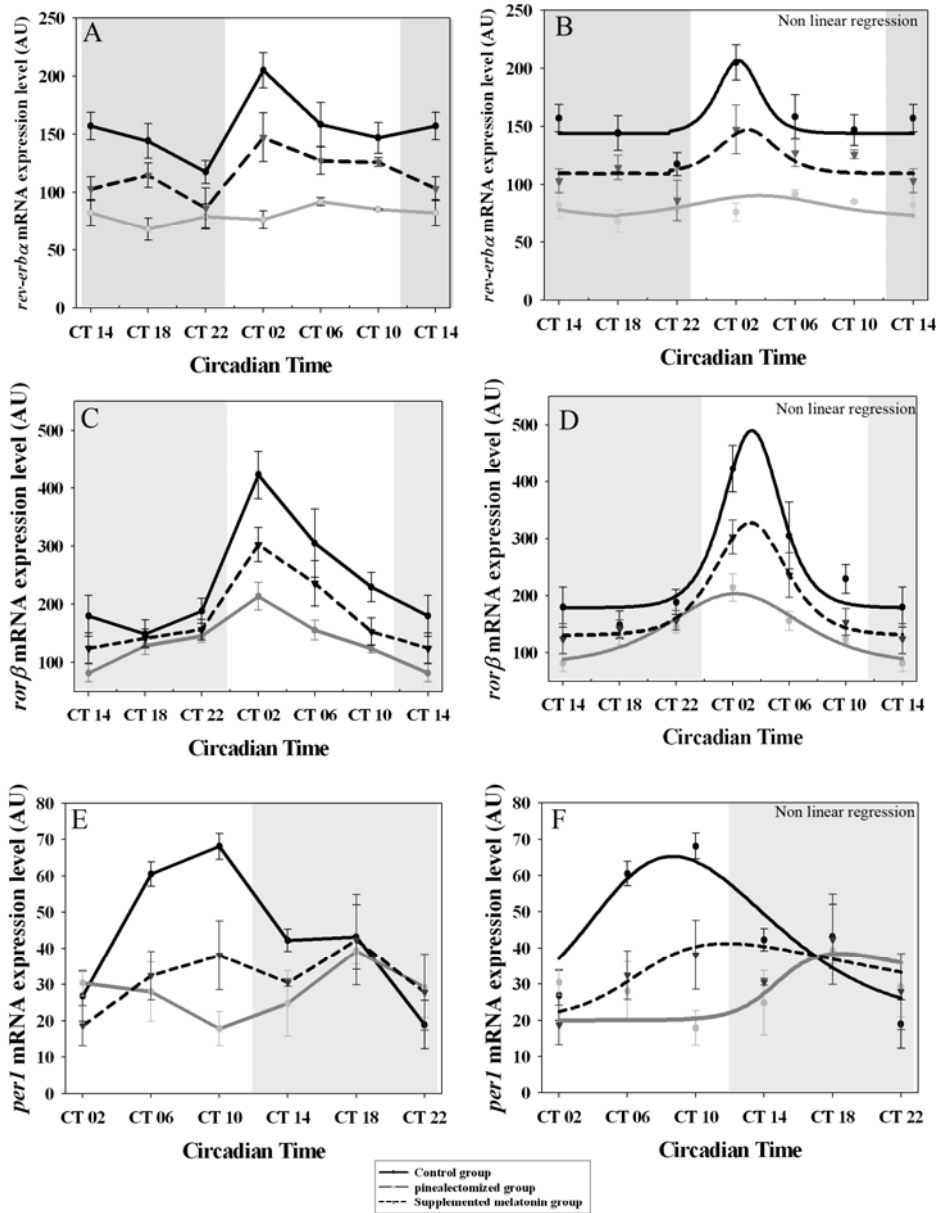
4. Clock genes mRNA expression in the rat SCN, 3 months after pinealectomy

The quantification of the mRNA expression of *bmal1* (A), *per1* (B) and *per2* (C), in arbitrary units (AU) and the non linear regression for mRNA level (D,E, F respectively) are presented for animals 3 months after pinealectomy (■), pinealectomy with supplemented melatonin (▼) or sham-operation (●). The gray and white backgrounds indicate the subjective night and subjective day respectively. Each point is the mean $\pm$ SEM of 5 animals and the CTs mentioned are the Circadian Time of sacrifice.

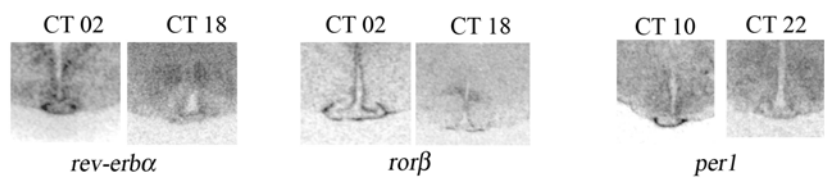


5. *Rev-erba*, *ror* and *per1* mRNA expression in the rat PT

The quantification of the mRNA expression of *rev-erba* (A), *ror* (B) and *per1* (C) in arbitrary units (AU) and the non linear regression for mRNA level (D, E and F respectively) are presented for animals 8 days after pinealectomy (■), pinealectomy with supplemented melatonin (▼) or sham-operation (●). The gray and white backgrounds indicate the subjective night and subjective day respectively. Each point is the mean $\pm$ SEM of 5 animals. The rat coronal brain sections hybridized with cRNA riboprobes are presented below the diagrams. PT sections were hybridized with 35 S-labelled antisense cRNA riboprobe (G), the CTs mentioned are the Circadian Time of the animal killings.



G



DISCUSSION



J'ai émis l'hypothèse selon laquelle ces récepteurs orphelins pourraient représenter des cibles de la mélatonine. Afin de tester cette hypothèse j'ai observé la réponse de ces gènes dans deux conditions, la première condition étant une approche chronobiotique après une injection pharmacologique de mélatonine. Nous avons donc étudié l'effet d'une injection unique de mélatonine sur les niveaux d'expression des ARNm des récepteurs orphelins pour tester leur éventuelle implication dans le rétrocontrôle de la mélatonine sur les NSC. L'injection à des doses pharmacologiques de mélatonine en fin de jour subjectif est un protocole engendrant à la fois des effets moléculaires et comportementaux chez le rat. C'est un bon moyen d'étude des cascades de transduction de la mélatonine dans les NSC même s'il ne reflète pas l'action physiologique de la mélatonine sur l'horloge. La seconde condition a été d'étudier la mélatonine en situation « physiologique ». Nous avons étudié l'expression des récepteurs orphelins chez des animaux dont la source de mélatonine endogène avait été supprimée par pinéalectomie 8 jours auparavant. En parallèle, un second groupe d'animaux pinéalectomisés a reçu un apport de mélatonine dans l'eau de boisson. Les rats buvant essentiellement la nuit, ce protocole restaure le rythme de mélatonine endogène circulante (Slotten et al., 1999a ; Pitrosky et al., 1999).

I. Les effets de la mélatonine sur les NSC

A. Effet de l'injection pharmacologique

L'une des actions de la mélatonine les mieux décrites est une avance de phase de l'activité locomotrice chez les rongeurs provoquée par une injection de mélatonine (1 mg/kg) en fin de jour subjectif (Sharma et al., 1999). Cette injection a également des effets moléculaires directs sur les NSC démontrés par une inhibition de la synthèse de l'AVP qui est une sortie de l'horloge (Watanabe et al., 1998 ; Jin et al., 1999), ainsi qu'une avance de phase de l'activité enzymatique de l'AA-NAT (enzyme limitante de la synthèse de mélatonine) (Humlova et Illnerova, 1990), deux rythmes directement sous contrôle circadien des NSC. Cependant, la mélatonine n'agit pas directement sur les gènes horloges des boucles moléculaires circadiennes principales. En effet, une étude menée au laboratoire (Poirel et al., 2003b) a montré qu'une injection unique de mélatonine à 1 mg/kg à CT 11.5 n'agit pas rapidement sur le rythme d'expression d'ARNm des gènes horloges *per1-3*, *cry1-2*, *bmal1* et *clock* au cours de la première nuit subjective. Cependant, au cours du jour subjectif suivant, cette injection de mélatonine induit un effet soit sur la phase, soit sur l'amplitude du rythme

d'expression de *per1*, *per3* et de *bmall* (Poirel et al., 2003b). Cependant, ces gènes ne sont pas les effecteurs rapides des actions de la mélatonine sur les NSC. Depuis cette étude, de nouveaux partenaires appartenant à la famille des récepteurs orphelins sont apparus dont il a été montré qu'ils appartenaient à la machinerie moléculaire circadienne.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que la mélatonine agit de façon précoce sur l'expression de *rev-erba* et *rorβ*. En effet, chez les animaux ayant reçu de la mélatonine, on observe des niveaux minimum d'expression d'ARNm de *rorβ* plus élevés que chez les animaux contrôles, quelques heures après l'injection de mélatonine, qui peuvent être dus soit à une diminution de la dégradation des ARNm (augmentation de la stabilité des ARNm, inhibition des protéines impliquées dans la reconnaissance et la dégradation des ARNm) soit à une augmentation légère mais significative de l'activation de la transcription de *rorβ*. *Rev-erba*, quand à lui, présente un décalage de phase de 1.3 heure de l'ensemble de son rythme d'expression dès la nuit subjective suivant l'injection. De nombreux travaux ont été effectués sur la régulation transcriptionnelle, sur le rôle et la modulation de ces facteurs de transcription, mais également sur les premiers messagers de la mélatonine exogène dans les NSC. **1)** Il est connu que les récepteurs orphelins interagissent entre eux pour contrôler leur expression. C'est le cas par exemple de *RORα* qui agit positivement sur l'expression de *rev-erba* et de *rorβ*, mais également de *REV-ERBα* qui agit négativement sur sa propre expression et sur celle de l'ensemble des gènes *ROR* via une séquence *RORE* commune, présente dans leur promoteur (Sato et al., 2004b ; Forman et al., 1994 ; Raspe et al., 2002b). **2)** L'activité des *ROR* peut être régulée par la CAM kinase IV, qui augmente l'action transcriptionnelle activatrice de ces protéines non pas par une phosphorylation de *ROR* mais par une régulation des interactions avec ses co-activateurs (Kane et Means, 2000). De plus, ces enzymes sont activées à la fois par une augmentation de Ca^{2+}_i mais également par phosphorylation. Cette activation par phosphorylation a déjà été observée dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Mizuno et al., FENS 2006, poster). **3)** La mélatonine est capable d'induire via ses récepteurs *MT_{1/2}*, une augmentation transitoire du niveau de Ca^{2+}_i . Ce phénomène bien qu'observé dans la PT et impliqué dans la libération de LH, n'en demeure pas moins possible dans les NSC. En effet, les récepteurs de la mélatonine appartenant aux récepteurs protéine G, sont capables via la sous-unité $\beta\gamma$ de cette protéine de recruter le Ca^{2+}_i présent dans les compartiments intracellulaires de stockage. Enfin, **4)** une étude *in vitro* portant sur les effets d'une application de mélatonine sur des coupes de NSC a montré que la PKC était indispensable à l'avance de phase du rythme d'activité électrique des

NSC induit par la mélatonine, car les inhibiteurs de cette enzyme empêchent ce déphasage (McArthur et al., 1997). L'ensemble de ces observations me permettent d'ébaucher une hypothèse (bien que cela reste très spéculatif) sur la voie d'action de la mélatonine sur *rorβ*. L'injection unique de mélatonine en fin de jour subjectif, pourrait engendrer soit une augmentation transitoire de Ca^{2+}_i , soit une activation de la PKC (ou les deux à la fois, ceci n'est pas à exclure). L'une ou l'autre de ces deux voies (ou les deux conjointement) provoqueraient par la suite une activation de la CAM kinase IV, soit par phosphorylation soit par augmentation calcique. Une fois activée, cette enzyme irait à son tour phosphoryler les co-activateurs de la protéine RORα modulant ainsi son action activatrice sur l'expression de *rorβ* via la séquence RORE de son promoteur, engendrant alors une augmentation transitoire du niveau d'expression.

La présence de la séquence RORE sur le promoteur de *rev-erba* permettant à la fois à RORα ou RORβ d'activer sa transcription, nous incite à supposer que l'effet de la mélatonine sur *rorβ* pourrait être la cause du déphasage du rythme d'expression de *rev-erba* observé. En effet, l'augmentation transitoire d'ARNm de *rorβ* pourrait donner un niveau protéique plus important et être suffisant pour induire l'expression de *rev-erba*. Le déphasage engendré s'expliquerait dans ce cas, par le dépassement d'un seuil d'activation synchronisant le rythme d'expression de ce facteur de transcription. Cependant, le très court délai, à savoir une heure à peine entre l'effet observé sur le niveau d'expression de *rorβ* et l'induction du déphasage de *rev-erba*, semble incompatible avec cette première hypothèse. Ce délai ne semble pas suffisant pour permettre une différence significative du niveau protéique de RORβ entre les deux groupes. Une autre hypothèse serait que l'effet observé sur l'expression de *rorβ* soit la conséquence de la présence sur le promoteur de *rorβ* de la séquence responsable de l'effet de la mélatonine sur *rev-erba*. On sait en effet, qu'à la fois *rev-erba* et *rorβ* présentent dans leur promoteur une séquence RORE et il a été démontré que RORα active la transcription des gènes via cette séquence comme c'est le cas pour *rev-erba*, *rorβ* ou *bmall*. L'effet observé sur *rorβ* serait donc juste le reflet de l'activation de RORα par phosphorylation de ses co-activateurs par la CAM kinase IV, donc un contrôle direct de *rorβ* par RORα. Par contre, *rev-erba* est non seulement sous le contrôle des dimères de C/B, PER/CRY mais également sous son propre rétrocontrôle négatif, engendrant ainsi un déphasage complet de son rythme d'expression.

Pour résumer, les effets de la mélatonine sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins seraient le fruit de la cascade des modifications post-traductionnelles suivantes: l'activation de la PKC par la mélatonine *via* son récepteur MT₁ qui engendrerait une phosphorylation de la CAM kinase IV qui, dans un second temps modulerait l'action de la protéine ROR α *via* la phosphorylation de ses co-activateurs. Enfin, une fois activée, la protéine ROR α régulerait la transcription des gènes *rev-erb α* et *ror β* provoquant une augmentation transitoire de *ror β* (correspondant peut-être à la période d'activation de ROR α) et de *rev-erb α* jusqu'à l'atteinte d'un seuil qui provoquerait le déphasage complet de son rythme d'expression. Le déphasage du rythme d'ARNm de *rev-erb α* induirait par la suite un déphasage similaire du rythme protéique de REV-ERB α qui provoquerait ensuite un déphasage du rythme d'expression de *bmal1*. L'action de la mélatonine au sein des boucles moléculaires serait initié par des récepteurs orphelins pour ensuite se transmettre aux autres gènes horloges.

En conclusion, une injection unique de mélatonine, responsable de l'effet quasi immédiat de l'action synchronisante de la mélatonine, engendre une augmentation faible et transitoire de sa concentration au niveau du cerveau. De plus, cet effet semble passer par une modification du niveau d'expression des ARNm des récepteurs orphelins. Nos résultats démontrent donc que la mélatonine a un effet immédiat, à court terme, sur l'expression des récepteurs orphelins ayant pour conséquence des effets à plus ou moins long terme sur les rythmes d'expression des gènes horloges. Ces travaux montrent pour la première fois que la mélatonine exogène est capable de moduler la phase de l'expression d'un gène appartenant aux boucles moléculaires de l'horloge et que cette action se répercute progressivement sur le rythme d'expression de *bmal1* dès la seconde nuit subjective, puis à l'ensemble des partenaires de ces boucles.

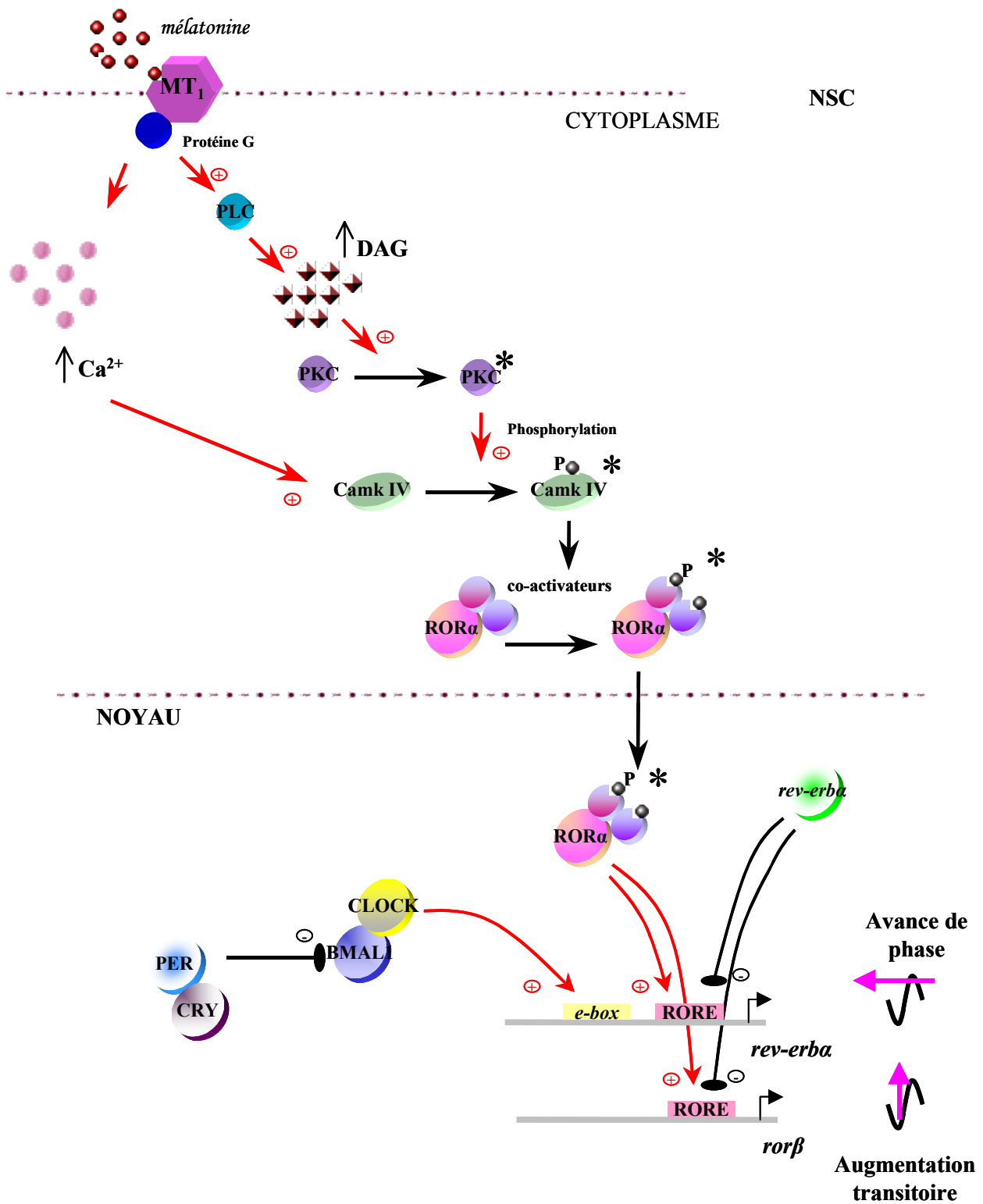


Figure 1 : Modèle hypothétique proposé pour la cascade de transduction de la mélatonine exogène dans les NSC.

* : protéine activée

B. Concentration de mélatonine dans les NSC

Nous avons vu qu'après une injection unique de mélatonine à 1 mg/kg, les concentrations plasmatiques de cette hormone atteignent des valeurs très supérieures à la normale ce qui témoigne du caractère pharmacologique de cette injection. En effet, il est généralement acquis que la concentration de la mélatonine dans le système nerveux central (SNC) est le reflet de celle dans le plasma. La mélatonine étant une hormone lipophile, nous pouvons donc supposer qu'elle passe facilement la barrière hémato-encéphalique (BHE) et puisse donc se répartir dans le SNC avec des concentrations similaires au plasma. Cependant, aucune estimation du niveau de mélatonine présente dans le cerveau et autour des NSC en particulier n'a été pratiquée jusqu'à présent par une autre méthode que la microdialyse. Celle-ci donne des valeurs de mélatonine trois fois plus élevées une heure après l'injection, mais cette augmentation n'est que transitoire car une demi-heure plus tard, on retrouve des valeurs similaires à celles des animaux témoins (Bothorel et al., 2002). La question se pose donc de savoir quelle quantité réelle de mélatonine franchit la BHE pour atteindre les NSC ? Afin de tenter de répondre à cette question, nous avons décidé d'étudier la concentration de la mélatonine dans un tissu cérébral facile à prélever, le cortex. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de RIA, pour doser les concentrations de mélatonine dans le plasma et le cortex pendant les 26 premières heures après une injection unique de mélatonine à 1 mg/kg en fin de jour subjectif (CT 11.5).

Au laboratoire, nous dosons en routine la mélatonine directement dans des glandes pinéales. En ce qui concerne les NSC, des essais ont été effectués à plusieurs reprises pour doser la mélatonine dans ces noyaux, mais les valeurs obtenus étaient trop faibles et ne permettaient pas d'atteindre le seuil de significativité du dosage, et donc de nous renseigner sur la concentration de mélatonine présente dans la région des NSC après une injection systémique de mélatonine à 1 mg/kg. J'ai supposé que la quantité de tissu utilisée ne devait pas être suffisante pour détecter la mélatonine. Afin de déterminer la quantité de tissu nécessaire pour y détecter l'hormone, des dosages de mélatonine ont été effectués dans le cortex de rats ayant reçu une injection systémique de mélatonine ou de sérum physiologique. Il est alors apparu que les quantités de tissu nécessaires pour détecter un niveau basal de mélatonine, étaient bien trop importantes pour permettre un dosage direct de la mélatonine comme il est pratiqué en routine pour la glande pinéale.

Il existe un second protocole pour le dosage de la mélatonine, qui consiste à extraire la mélatonine du plasma. J'ai alors adapté ce protocole pour le cortex, à partir de celui utilisé pour le dosage dans la glande pinéale afin d'obtenir des valeurs significatives de mélatonine. La quantité de tissu prélevée m'a permis d'obtenir des niveaux détectables de mélatonine dans le cortex mais surtout d'observer la présence d'un rythme de mélatonine chez les animaux contrôles, dont le profil est similaire à celui observé dans le plasma. Ces résultats ne sont encore que préliminaires, car il convient de préciser que les dosages ont été effectués sur des parties de cortex et les valeurs que nous avons obtenues, ont été rapportées à des grammes de tissu et non à des quantités de protéine. Il aurait été plus rigoureux de reporter les valeurs de mélatonine à des grammes de protéine car, même si le même protocole a été respecté pour chaque échantillon, on ne peut exclure des variations dues à l'expérimentateur. Cependant les extractions se pratiquent avec une solution de tricine contenant déjà de la gélatine. Les faibles variations de protéines mesurées dans le cortex sont donc complètement masquées par la forte teneur protéique de la solution. Afin d'y palier, j'ai alors tenté cette extraction à l'aide d'une solution de PBS (une solution qui n'interfère pas avec le dosage protéique) mais sans toutefois réussir à détecter la mélatonine à un niveau significatif. Le second problème inhérent à ce protocole est que le tissu utilisé était du cortex. En effet, des travaux effectués au sein de l'équipe de Benoît Malpoux ont montré une régionalisation de la concentration de la mélatonine dans le cerveau chez la brebis (Tricoire et al., 2002 ; Legros et collaborateurs communication personnelle, *Frontiers in Neuroendocrinology* vol 27, number1, May 2006 p130). Cette régionalisation de la concentration de la mélatonine tient sans doute à la localisation particulière de la glande pinéale dans le SNC. En effet, chez la brebis, la glande pinéale est profondément ancrée entre les hémisphères cérébraux et la mélatonine est transportée par le récessus pinéalien vers le troisième ventricule pour se déverser dans le LCR (Tricoire et al., 2002). Synthétisée, elle diffuse autour des structures avoisinantes. Chez le rat, elle est localisée à la surface des hémisphères cérébraux : la diffusion de la mélatonine et donc la régionalisation de sa concentration doit être différente. Ces dosages devront donc être faits sur des quantités suffisantes de tissu hypothalamique (à estimer) au niveau des NSC afin de détecter un signal. Il conviendra de déterminer précisément la quantité de tissu prélevée, au niveau des NSC en évitant les tissus adjacents. Il sera donc vraisemblablement nécessaire de regrouper plusieurs animaux par point horaire. Malgré toutes ces réserves, ces résultats préliminaires n'en demeurent pas moins intéressants et peuvent être discutés.

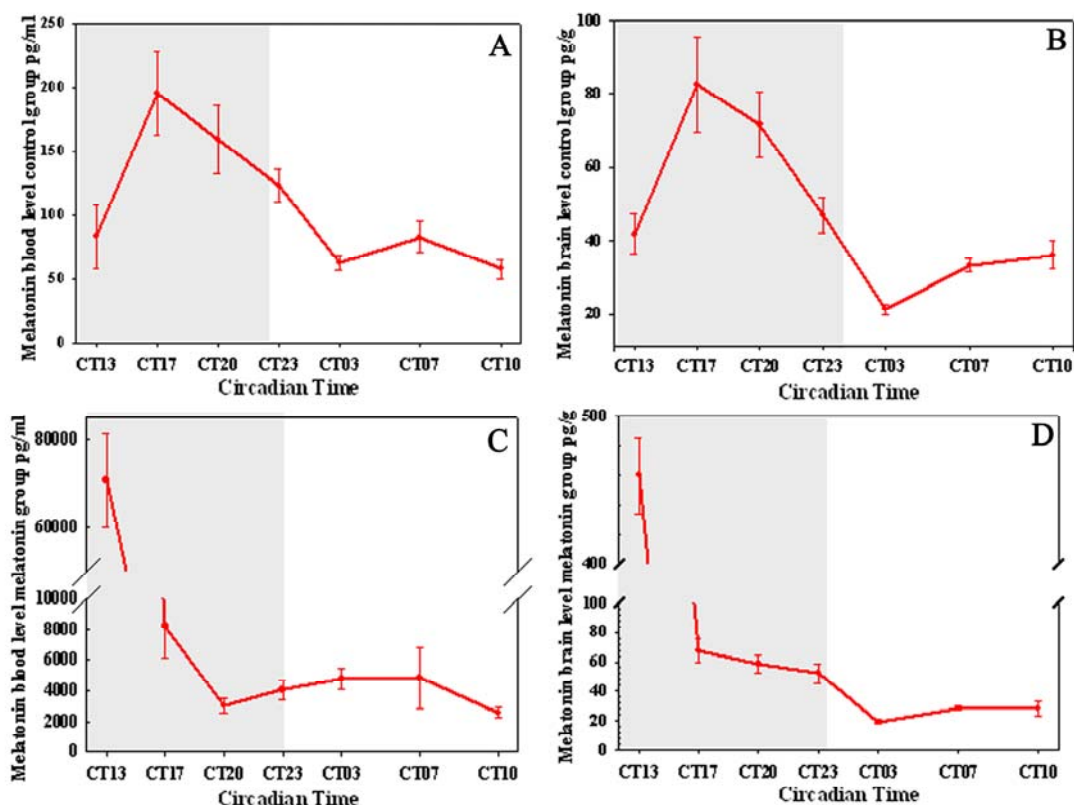


Figure 2 : Dosage de la mélatonine après une injection pharmacologique de mélatonine dans le plasma ou le cortex.

A : Niveau plasmatique de mélatonine chez les animaux contrôles

B : Niveau cortical de mélatonine chez les animaux contrôles

C : Niveau plasmatique de mélatonine chez les animaux ayant reçu une injection pharmacologique de mélatonine (1 mg/kg)

D : Niveau cortical de mélatonine chez les animaux ayant reçu une injection pharmacologique de mélatonine (1 mg/kg)

Nous observons un rythme circadien de mélatonine dans le plasma des animaux contrôles avec des concentrations maximales de 200 pg/ml, durant la nuit subjective et des concentrations minimales de 75 pg/ml, durant le jour subjectif (figure 2A). Ce rythme déjà rapporté dans la littérature, avec un maximum durant la nuit subjective et un minimum durant le jour, valide notre protocole de dosage de la mélatonine dans le plasma. Dans le cas des animaux qui ont reçu l'injection de mélatonine, nous observons une concentration plasmatique supérieure à 2 000 pg/ml tout au long de l'expérience, avec un pic à 70 000 pg/ml pendant les premières heures suivant l'injection. Ceci est facilement expliqué par l'apport

massif de mélatonine dû à l'injection qui se traduit par une augmentation dans le plasma de 350 fois supérieure à celle des animaux contrôles (figure 2C). La mélatonine est alors stockée dans les tissus lipidiques en raison de son caractère amphiphile, la protégeant ainsi de la dégradation malgré sa demi-vie très courte. Les très hautes valeurs observées pendant plus de 24 heures après l'injection, pourraient donc être expliquées par une libération en continu de cette hormone, dans le plasma. Dans le cas des dosages de la mélatonine dans le cortex de ces mêmes animaux, les résultats préliminaires que nous avons obtenus chez ceux injectés avec une solution saline, montrent le même rythme circadien de mélatonine que celui observé dans le plasma. En effet, la concentration de mélatonine présente un rythme avec un niveau maximum de 80 pg/g de tissu durant la nuit subjective et un minimum de 20 pg/g de tissu durant le jour (figure 2B). Ce qui nous permet non seulement de valider ce protocole de dosage tissulaire ; mais aussi les résultats obtenus chez les animaux ayant reçu une injection de mélatonine à 1 mg/kg en fin de jour subjectif (figure 2D). Chez ces animaux, une forte concentration de mélatonine apparaît dans le cerveau juste après l'injection (pic à CT 13). Cependant, cette augmentation n'est que cinq fois supérieure à celle des animaux contrôles alors que dans le plasma, le facteur est de 350. De plus, cette augmentation n'est que transitoire puisqu'on retrouve rapidement des valeurs similaires à celles du groupe injecté avec de la solution saline. Dès CT 17, soit 6.5 heures après l'injection, les deux groupes présentent une concentration de mélatonine proche de 80 pg/g de tissu. Ce retour à des concentrations de la mélatonine dans le cerveau identiques aux animaux contrôles a déjà été observé par microdialyse dans la glande pinéale (Borthorel et al., 2002). En effet, après une injection unique de mélatonine à 1 mg/kg vers CT 11.5, les auteurs avaient retrouvé des niveaux de mélatonine dans la glande pinéale identiques aux niveaux contrôles, deux heures après l'injection. Nos résultats préliminaires montrent également qu'après une injection pharmacologique de mélatonine, la concentration de l'hormone dans le cortex, n'augmente pas de la même façon que dans le plasma. Ce décalage est vraisemblablement dû au coefficient de diffusion de la mélatonine à travers la BHE du sang vers le liquide céphalo-rachidien (LCR) et réciproquement. L'équipe de Benoît Malpaux avait déjà montré chez la brebis des différences entre la concentration de mélatonine dans le plasma et celle dans le LCR (pour revue Reiter et Tan, 2003). En effet, une étude en parallèle de la concentration de la mélatonine dans ces deux milieux, montre que le niveau maximal dans le LCR est dix fois supérieur à celui dans le plasma ; qui est lui même plus faible que celui observé dans le troisième ventricule (Skinner et Malpaux, 1999 ; Tricoire et al., 2002). De plus, Sallinen et collaborateurs ont montré des concentrations de mélatonine différentes suivant les tissus

nerveux ou périphériques. Dans ces derniers, ces différences seraient dues à une concentration en lipide différente mais également au transport de la mélatonine jusqu'à ses sites d'action (Sallinen et al., 2005). Enfin, Legros et collaborateurs ont montré récemment chez le mouton que la concentration de mélatonine est plus élevée dans le cerveau que dans le plasma, au cours du jour subjectif, suggérant que la diffusion de la mélatonine est contrôlée non seulement du plasma vers le cerveau mais également du cerveau vers le sang (communication personnelle, *Frontiers in Neuroendocrinology* vol 27, number1, May 2006 p130).

Ces résultats montrent pour la première fois que l'augmentation de la concentration de mélatonine dans le SNC en réponse à l'injection de mélatonine atteint des valeurs qui restent néanmoins dans une gamme qui pourrait être considérée comme physiologique. En effet, cette augmentation transitoire chez les animaux injectés n'est que cinq fois supérieure à la concentration maximale de mélatonine mesurée au cours de la nuit dans le cortex des animaux contrôles. De plus, après invalidation de ce gène *mt₁*, les sites de la liaison de la 2-¹²⁵I-mélatonine disparaissent dans les NSC et la PT. Ainsi, l'expression de ce sous-type semble être à la base des sites de liaison exprimés dans ces structures (Poirel et al., 2002). L'ensemble de ces résultats nous permet d'exclure l'implication potentielle d'un autre récepteur dans les effets de la mélatonine sur les NSC. On peut se demander également s'il ne faudrait pas remettre en question l'action pharmacologique d'une telle injection sur les NSC.

C. Effet de la pinéalectomie

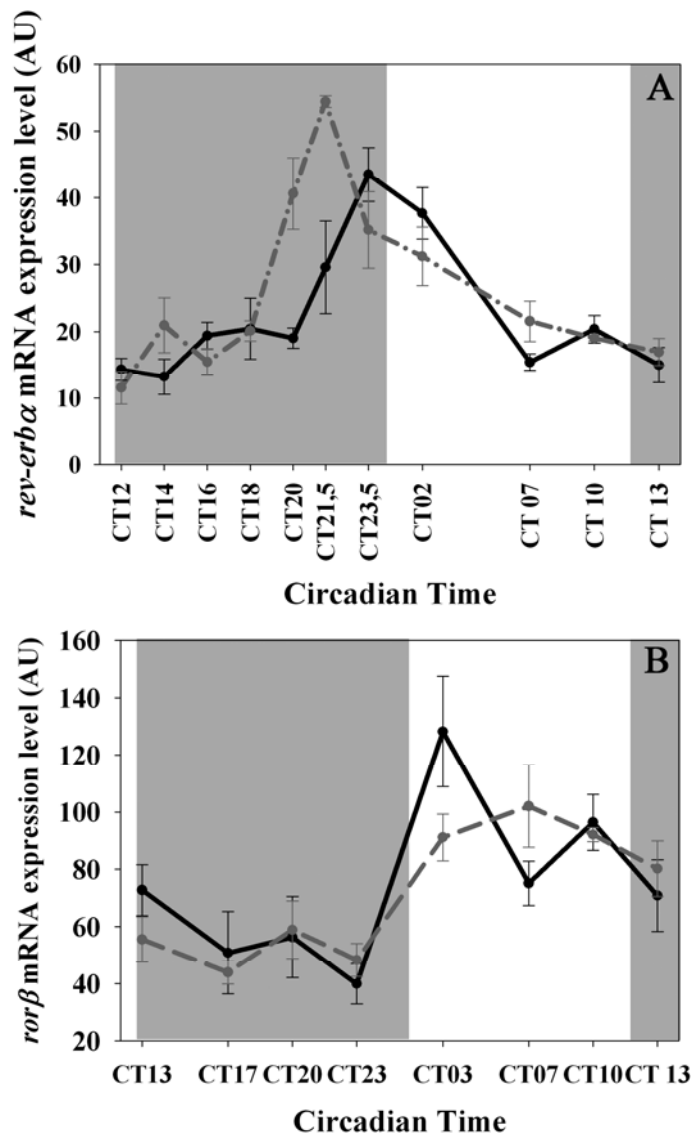
Mes premiers résultats montrent que *rorβ* et *rev-erba* sont impliqués dans les mécanismes de réponses du système circadien aux informations chronobiotiques véhiculées par les injections de mélatonine exogène. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle ces gènes, cibles de la mélatonine dans ce contexte expérimental, pourraient ainsi être impliqués dans l'intégration par le système circadien des informations véhiculées par le pic physiologique de la mélatonine. Nous avons donc quantifié les niveaux d'expression de ces gènes après ablation de la source principale de mélatonine circulante. Nous avons voulu voir si l'absence de mélatonine plasmatique modifie le patron d'expression des ARNm de ces récepteurs orphelins dans les NSC. Cependant, tout comme pour les gènes horloges dans cette structure cérébrale (VonGall et al., 2002), la pinéalectomie n'a pas d'effet sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins dans les NSC au bout de 8 jours suggérant que l'expression rythmique de ces gènes n'est pas contrôlée par la mélatonine endogène. La

persistance des rythmes des différents gènes horloges en l'absence d'information mélatoninergique, a été montrée chez des souris ayant une délétion pour les récepteurs de la mélatonine *mt₁* ou *mt₂* mais également chez une souche de souris sans rythme de synthèse mélatoninergique (Jilg et al., 2006 ; Stehle et al., 2002 ; Johnson et al., 2006). Ces résultats ne nous permettent pas d'éclaircir la signification du rétrocontrôle mélatoninergique sur les NSC. L'information circadienne mélatoninergique est générée par l'horloge et se trouve donc obligatoirement en phase avec celle du temps circadien des NSC, ce qui semble exclure une action physiologique de la mélatonine. Les NSC ne semblent donc pas avoir besoin de cette information redondante pour exprimer leur propre rythmicité. Cependant les rétrocontrôles physiologiques traditionnels agissent sur l'amplitude des paramètres contrôlés plutôt que sur la phase de ceux-ci. La fonction principale de la mélatonine endogène pourrait donc être le maintien de l'amplitude de la rythmicité des NSC. Nous avons donc effectué une seconde expérience où les animaux ont été sacrifiés après une absence de mélatonine plus longue dans le but d'étudier les conséquences de cette privation de l'hormone sur l'amplitude des oscillations des gènes horloges et des récepteurs orphelins dans les NSC. Cependant, même après 3 mois, les rythmes de l'ensemble des partenaires moléculaires de l'horloge sont restés intacts. Ces résultats confirment que la mélatonine n'est nécessaire ni à l'expression de la rythmicité de l'expression de gènes horloges et des récepteurs orphelins, ni à l'amplitude de cette rythmicité. Le rôle physiologique du rétrocontrôle de la mélatonine sur l'horloge reste donc à élucider.

II. Les effets de la mélatonine sur la PT

A. Effet de l'injection pharmacologique

Chez les rongeurs, la mélatonine régule l'expression des gènes horloges dans la PT suggérant que la réponse à la mélatonine est spécifique à chaque tissu (VonGall et al., 2002 et 2005 ; Jilg et al., 2005 ; Messenger et al., 2001 ; Johnston et al., 2006). Nous avons donc voulu savoir si le lien existant entre la mélatonine et les récepteurs orphelins observé dans les NSC, pouvait également s'observer dans un tissu impliqué dans la lecture de l'information photopériodique convoyée par la mélatonine comme l'est la PT. Nous avons pratiqué une injection de mélatonine en fin de jour subjectif, un protocole que nous avons déjà utilisé pour étudier l'effet de la mélatonine dans les NSC sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins.



*Figure 3 : Effet d'une injection pharmacologique de mélatonine (1 mg/kg) à CT 11.5 sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins *rev-erba* (A) et *rorβ* (B) dans la PT chez le rat. Quantification du rythme d'expression d'ARNm de *rev-erba* (A) et de *rorβ* (B) pendant les 26 premières heures après une injection unique de mélatonine (1 mg/kg) (●) ou de solution saline (○) à CT 11.5. Les fonds gris et blanc indiquent la nuit et le jour subjective respectivement. Chaque point correspond à la moyenne $\pm$ SEM de 5 animaux et les CTs mentionnés sont les temps circadiens des sacrifices.*

L'expression de *rev-erba* dans la PT suit un rythme de 24 heures avec un maximum d'expression vers CT 03 et un minimum d'expression durant la nuit subjective vers CT 20 (figure 3A). Il semble y avoir, tout comme dans les NSC, une avance de phase du même ordre du rythme d'expression de *rev-erba*. L'expression de *rorβ* dans la PT suit un rythme de 24 heures dans la PT avec un maximum d'expression vers CT 03 et un minimum d'expression durant la nuit subjective vers CT 23 (figure 3B). Par contre, l'injection de mélatonine en fin de jour subjectif est sans effet sur le rythme d'ARNm de *rorβ* dans la PT, contrairement à ce qui est observé dans les NSC. Les récepteurs orphelins ont donc une réponse tissu-spécifique, tout comme certains gènes horloges : *cry1* et *per1* (Dardente et al., 2003b ; Poirrel et al., 2003b). De plus, *rorα* ne semble pas être exprimé dans la PT excluant une implication de cette protéine dans les boucles moléculaires circadiennes. L'ensemble des résultats suggèrent une cascade de transduction différente. Bien que l'injection de mélatonine soit sans effet immédiat sur le rythme d'expression de l'ARNm de *rorβ*, il serait intéressant d'étudier les conséquences de cette injection sur le rythme de RORβ. En effet, il a déjà été montré que RORβ, qui a une action redondante à RORα, est lié plus ou moins directement à la mélatonine dans la glande pinéale (Schaeren-Wiemers et al., 1997), dans la PT (Guerrero H., communication personnelle) et dans les NSC (mes résultats). Cette protéine pourrait remplacer RORα dans les boucles moléculaires circadiennes de la PT. Tout comme postulé pour RORα dans les NSC, RORβ (ou comme pour RORα, certains de ses co-activateurs) serait activé par phosphorylation après une injection de mélatonine en fin de jour subjectif pour agir positivement sur le rythme d'expression de *rev-erba* dans la PT. Quand à *rorγ*, aucune étude n'a été portée sur ce gène mais son implication ne peut pas être écartée. Nous ne pouvons également pas exclure que les gènes horloges, contrôlant l'expression de *rev-erba* via les séquences *e-box* présentes dans son promoteur, soient aussi responsables des effets observés sur l'expression de ce gène. L'étude de l'effet d'une injection de mélatonine sur le rythme d'expression de BMAL1 ou de CLOCK reste donc à faire. De plus, il convient d'approfondir l'étude du promoteur de *rev-erba* (déjà commencé par Triqueneaux et collaborateurs en 2004) afin de déterminer la présence potentielle d'une séquence caractéristique telle que CRE, comme pour *per1*. En réponse à une injection de mélatonine, l'étude des gènes qui y sont directement reliés, permettra d'ébaucher des pistes de recherche et ne pas se cantonner à une implication potentielle des gènes horloges ou des récepteurs orphelins.

B. Effet de la pinéalectomie

En parallèle à nos travaux menés sur les NSC, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une privation de la source principale de mélatonine endogène qu'est la glande, pinéale sur les rythmes d'expression des gènes horloges et des récepteurs orphelins dans la PT. Cette ablation de la glande pinéale induit la perte du rythme d'expression de *rev-erba* et de *rorβ* dans la PT. Il est connu que le rythme de sécrétion de la mélatonine est responsable de nombreuses réponses circadiennes et saisonnières. C'est ainsi que certains gènes horloges présentent une perte de leur rythme journalier d'expression chez des animaux sans mélatonine circulante (souris C57BL6 ou animaux en LL) ou ayant une invalidation du récepteur *mt₁* de la mélatonine (VonGall et al., 2005 ; Johnston et al., 2006). De même, le rythme circadien et saisonnier de la densité des récepteurs de la mélatonine dans la PT est sous le contrôle de cette hormone alors que dans les NSC, le rythme circadien de la densité des récepteurs de la mélatonine est sous le contrôle direct de l'alternance jour/nuit (Gauer et al., 1994a ; 1994b). Cependant les mécanismes d'intégration de ces deux types de messages ne sont pas clairs. La PT a les mêmes partenaires (à l'exception de *rorα*) que ceux impliqués dans les boucles moléculaires circadiennes des NSC, mais ces oscillations ne sont pas auto-entretenues dans la PT, soulignant ainsi la différence entre un oscillateur vrai (auto-entretenu) et un oscillateur périphérique (dont les oscillations s'amortissent progressivement). Il convient cependant de clarifier le rôle de la mélatonine dans l'entretien des oscillations des gènes horloges et des récepteurs orphelins au sein même de la PT. Nous pouvons émettre trois hypothèses, qui restent spéculatives, quant au rôle potentiel de la mélatonine dans les oscillations circadiennes des différents gènes impliqués. La première est que la transcription des gènes présente une rythmicité indépendante mais que leur expression initiale nécessite la présence du rythme de sécrétion de la mélatonine (soit en tant qu'activateur, soit en inhibant un inhibiteur initial). La seconde hypothèse est que la mélatonine contrôlerait directement le rythme circadien de l'expression de l'ensemble de ces gènes. Dans ce cas, la PT ne serait pas un véritable oscillateur mais plutôt un système répondant passivement au message endocrine circadien véhiculé par la mélatonine. Il existe plusieurs arguments en faveur de cette hypothèse. D'une part, une injection unique de mélatonine en fin de jour subjectif, est capable d'induire une augmentation transitoire importante du niveau d'expression de *cryI* (Dardente et al., 2003b). D'ailleurs, chez les animaux contrôles, le pic d'ARNm de *cryI* est parallèle au pic de mélatonine. La mélatonine pourrait donc être le facteur initiateur d'une révolution des boucles moléculaires circadiennes. Cependant, cette hypothèse n'est pas facilement compatible avec ce que nous savons de l'auto-entraînement des

boucles moléculaires. En effet, des résultats précédents ont montré une persistance de la rythmicité de l'expression de *per2 in vitro* dans de nombreuses cellules dont les fibroblastes (Welsch et al., 2004). La troisième hypothèse est que la PT est un oscillateur périphérique possédant les éléments de base pour générer une oscillation circadienne mais que comme pour tous les autres oscillateurs périphériques, ces oscillations s'atténuent puis disparaissent en quelques jours, en libre cours (ex : *in vitro*). L'action initiale de la mélatonine peut également être à la fois une réinitialisation et un entraîneur du rythme généré par ces boucles moléculaires.

Le second volet de l'exploration du rôle physiologique de la mélatonine consiste à étudier chez l'animal pinéalectomisé, les effets de la restauration de variations journalières de mélatonine, par une supplémentation de la mélatonine dans l'eau de boisson sur les différents rythmes d'expression des ARNm des gènes horloges et des récepteurs orphelins. Ce protocole est connu pour induire des variations journalières de mélatonine dans le sang (Pitrosky et al., 1999 ; Sloten et al., 1999b). On observe chez ces animaux supplémentés en mélatonine, la restauration d'une rythmicité de l'expression des ARNm de *rorβ* et *rev-erba*. Cependant, l'amplitude du rythme d'expression de ces deux récepteurs orphelins n'est pas complètement restaurée. Une première hypothèse a été émise et suppose l'existence d'un effet dose de la mélatonine sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins dans la PT. En effet, la quantité de mélatonine ayant atteint la PT n'est pas connue. Cependant, il a été montré que le rythme d'expression de PER1, qui disparaît également chez les animaux pinéalectomisés, n'est que partiellement restauré par des injections quotidiennes de mélatonine à 1 mg/kg (VonGall et al., 2002) et nous avons vu que ces injections induisent une multiplication par cinq du niveau observé de mélatonine au niveau du cortex chez les animaux contrôles. L'ensemble de ces résultats ne sont pas en faveur de cette première hypothèse.

La seconde hypothèse émise pour expliquer ces résultats, suppose l'existence d'une seconde molécule couplée à la mélatonine et impliquée dans les rythmes d'expressions des récepteurs orphelins et de *per1* dans la PT. Une relation entre la mélatonine et l'adénosine a été évoquée par VonGall et ses collaborateurs. En effet, des administrations quotidiennes d'agoniste du récepteur de l'adénosine A2b, le NECA, pendant 6 jours, chez des hamsters Sibériens pinéalectomisés, évite la perte du rythme d'expression de PER1 (VonGall et al., 2002). Dans ce même article, les auteurs observent également des niveaux supérieurs de PER1, dans des coupes de PT, après application à la fois de mélatonine et du NECA. Ce qui pourrait expliquer le fait de la prévention partielle de la perte des rythmes d'expression des

récepteurs orphelins. La cascade transductionnelle semble être la voie AMPc. En effet, une régulation de l'expression de *rorβ* par cette voie AMPc a été décrite dans la glande pinéale (Brydon et al., 1999). Il a été également montré que la voie AMPc et les récepteurs A2b de l'adénosine sont impliqués dans le rythme d'expression de *per1* (VonGall et al., 2002). Alors que les récepteurs A2b de l'adénosine sont couplés positivement à l'AC (Stehle et al., 1992 et 1995), les récepteurs de la mélatonine y sont couplés négativement (VonGall et al., 2002). De plus, les récepteurs de la mélatonine sont capables d'induire la sensibilisation de la voie de l'AMPc (Godson et Reppert, 1997 ; Witt-Enderby et al., 1998 ; McNulty et al., 1994). Ce qui a conduit Hazlerigg et ses collaborateurs à émettre l'hypothèse selon laquelle la disparition de la sensibilisation mélatoninergique de la voie de l'AMPc par la pinéalectomie, pouvait rendre inapte cette voie à diriger les rythmes d'expression des gènes horloges (Hazlerigg et al., 1993). Cependant, d'autres cascades de transductions doivent être prises en compte telles qu'une augmentation transitoire de Ca^{2+} qui est capable d'activer la transcription des gènes *ror* via l'histone désacétylase (Kane et Means, 2000). Le récepteur de la mélatonine MT₁ peut induire via les protéines G cette augmentation transitoire de Ca^{2+}_i et agir sur le rythme de transcription des gènes *ror*. Des liens entre *rorβ* et la mélatonine ont déjà été décrit précédemment dans la glande pinéale (Baler et al., 1996). Cependant, peu de choses sont connues sur la régulation de *rorβ* par la mélatonine et son rôle dans l'horloge circadienne moléculaire.

La mélatonine pourrait sensibiliser la voie AMPc du récepteur de l'adénosine. Cette action de sensibilisation se ferait chaque jour mais disparaîtrait dès la première nuit sans mélatonine (VonGall et al., 2002). Cependant, nous ne pouvons exclure que la différence d'amplitude constatée entre le groupe contrôle et le groupe supplémenté en mélatonine ne soit pas plutôt due au protocole lui même. En effet, la mélatonine ajoutée dans l'eau de boisson est présente durant la totalité du nyctémère. Même si la prise hydrique est faible durant le jour, elle peut tout de même avoir pour conséquence la présence de mélatonine dans le sang. L'amplitude des variations journalières de la mélatonine plasmatique serait donc moins prononcée dans le groupe supplémenté en mélatonine que dans le groupe contrôle. Cette différence d'amplitude pourrait donc retentir sur celle des rythmes d'expression des gènes horloges et des récepteurs orphelins. Cependant, les résultats obtenus dans la PT, nous confirment l'implication directe de la mélatonine dans le contrôle des rythmes d'expression des différents gènes horloges et des récepteurs orphelins dans la PT. Nous pouvons donc nous poser ces questions : la mélatonine ne

serait-elle pas le messager circadien de la PT ? Cette hormone ne serait-elle pas responsable de la transmission du message circadien ? et donc la mélatonine ne génère t-elle pas la rythmicité circadienne au sein de la PT ?

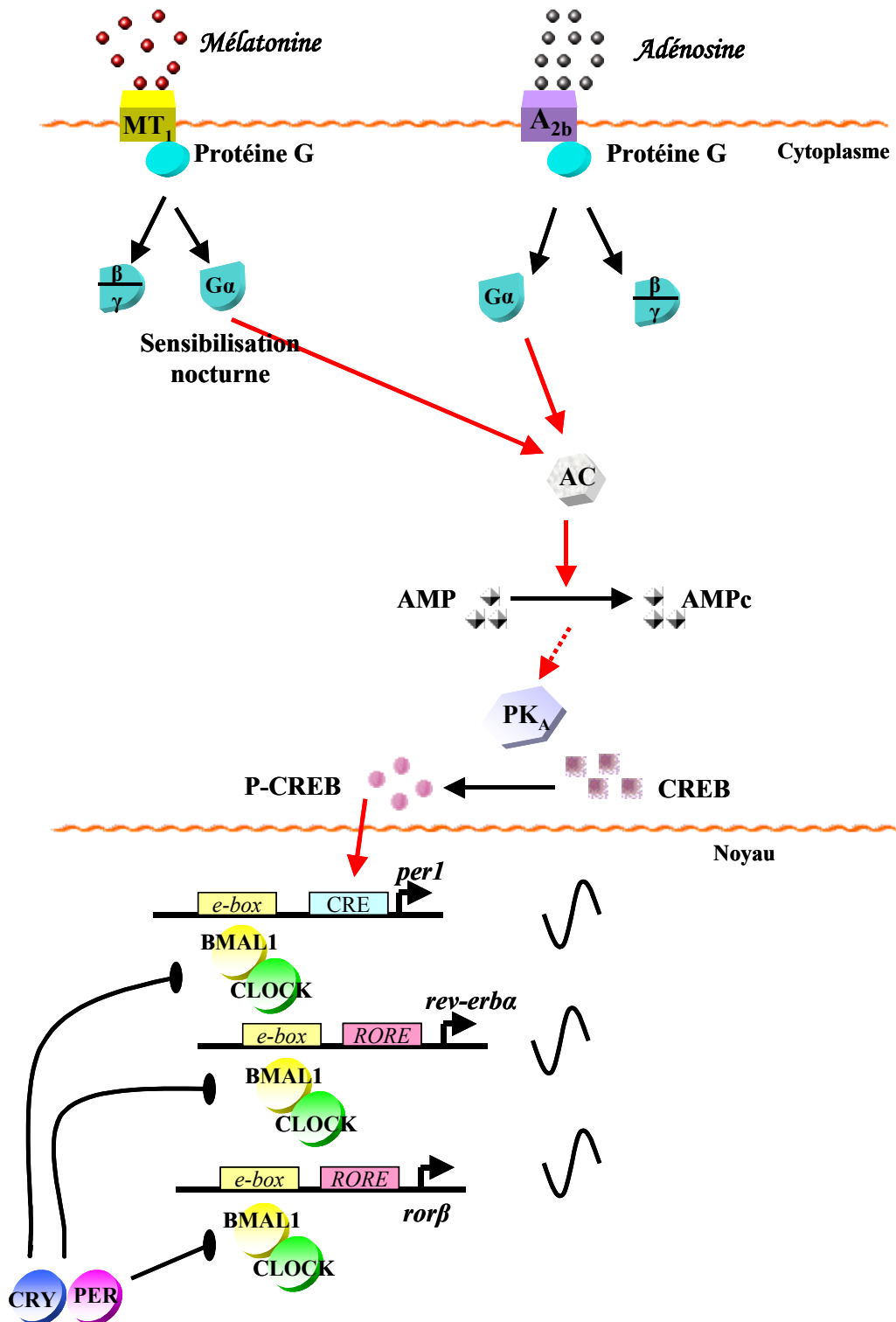


Figure 4 : Contrôle des rythmes d'expression des gènes horloges et des récepteurs orphelins dans la PT et conséquences d'une pinéalectomie.

Il est clair à présent, que la mélatonine joue un rôle essentiel dans la régulation des fonctions rythmiques. Mais si son rôle est bien défini dans le cas des fonctions saisonnières, puisque de nombreux effets ont été observés (Goldman et Darrow, 1983 ; Karsh et al., 1984 ; Tamarkin et al., 1985 ; Pévet, 1988b), il reste encore des interrogations dans le cas des fonctions circadiennes. Les cibles précoces au niveau des NSC sont caractérisées, mais leur implication dans une fonction physiologique de la mélatonine reste imprécise. Dans le cas de la PT, la mélatonine semble exercer un contrôle direct de l'ensemble des rythmes d'expression des différents gènes horloges et récepteurs orphelins à la base de la génération de la rythmicité circadienne au sein de cette structure. Les études réalisées au cours de mon travail de thèse ouvrent des perspectives intéressantes qui pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de la mélatonine. Ces travaux montrent également l'importance d'une étude concomitante des effets de la mélatonine dans au niveau de deux structures aux fonctions bien différentes que sont les NSC et la PT.

PERSPECTIVES



J'ai donc montré que la réponse à la mélatonine est tissu spécifique. Cependant, la cascade intracellulaire du message mélatoninergique jusqu'à *rev-erba* et/ou *rorb* reste obscure et plusieurs hypothèses sont à approfondir. Ces perspectives se divisent en deux grandes parties : la PT et les NSC.

III. La voie d'action de la mélatonine dans la PT

Nous avons évoqué l'existence possible d'une relation entre la mélatonine et l'adénosine au cours de notre discussion générale. En effet, des administrations quotidiennes d'agoniste du récepteur de l'adénosine A2b, le NECA, pendant 6 jours chez des hamsters Sibériens pinéalectomisés, évitent la perte du rythme d'expression de PER1 (VonGall et al., 2002). Dans le même article, les auteurs observent également des niveaux supérieurs de PER1 dans des coupes de PT, quand de la mélatonine est administrée avec le NECA. Ces résultats pourraient expliquer le fait que la supplémentation en mélatonine après pinéalectomie résulte en une prévention partielle de la perte des rythmes d'expression des récepteurs orphelins. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'administration de NECA sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins mais aussi sur celui des gènes horloges chez des rats pinéalectomisés. Cette étude nous permettrait de voir si comme chez le hamster Sibérien, l'expression de PER1 est sous le contrôle de la voie AMPc-CREB. L'étude des répercussions sur les rythmes d'expression des gènes horloges nous permettra de savoir si comme pour *per1*, leur expression rythmique est sous le contrôle de cette voie AMPc-CREB. Pour cela, un premier groupe de rats Wistar mâles non pinéalectomisés et injectés avec la solution de dilution du NECA servira de contrôle à l'ensemble de l'expérience. Quatre groupes d'animaux pinéalectomisés seront soit injectés avec la solution de dilution du NECA et supplémentés avec de la mélatonine, soit injectés avec du NECA (1 mg/kg ; et supplémentés avec la solution de dilution de la mélatonine), soit injectés avec la solution de dilution du NECA et supplémentés avec la solution de dilution de la mélatonine, afin de déterminer le rôle respectif de ces deux molécules sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins mais aussi sur celui des gènes horloges. Enfin, un dernier groupe d'animaux pinéalectomisés sera à la fois injectés avec une solution de NECA (1 mg/kg) et supplémentés mélatonine afin d'étudier les conséquences de l'association de ces deux molécules sur les rythmes d'expression des récepteurs orphelins et des gènes horloges. Il convient de préciser que la mélatonine ne sera distribuée aux animaux qu'au cours de la nuit et non plus accessible toute la journée. Les biberons contenant les solutions de mélatonine ou de véhicule de l'hormone

seront placés en début de nuit (CT 12) et retirés au début du jour (CT 24). Ceci nous permettra également de répondre à une des questions abordées au cours de mes recherches : la différence d'amplitude serait-elle la conséquence de la prise hydrique diurne des animaux ? Il est cependant à noter qu'en opposition à l'expérience pratiquée par VonGall et collaborateurs, la mélatonine ne sera pas injectée mais administrée tout au long de la nuit dans l'eau de boisson. La justification de ce changement de protocole vient d'un résultat obtenu au cours de ma thèse. Les concentrations de mélatonine présentes au niveau du tissu nerveux après une injection pharmacologique unique de mélatonine ne semblent élevée que temporairement et dans les heures qui suivent, les valeurs sont semblables à celles des animaux non injectés. Dans le cas des injections, nous conserverons cependant le protocole proposé par VonGall et ses collaborateurs à savoir une injection quotidienne de NECA à 1 mg/kg à CT 24. Ces protocoles d'injections et de supplémentation se dérouleront sur 6 à 8 jours et les animaux seront sacrifiés durant les 24 heures suivantes.

IV. Le schéma temporel d'action de la mélatonine dans les NSC

Les résultats que j'ai obtenus montrent pour la première fois des cibles précoces de l'hormone au cœur des boucles moléculaires circadiennes dans l'horloge principale des Mammifères. Bien que ces effets ne soient pas dus à des concentrations physiologiques de mélatonine, ils sont les bases qui vont nous permettre de remonter la cascade de transduction des récepteurs mélatoninergiques. J'ai évoqué plusieurs cascades moléculaires impliquées dans les effets de la mélatonine sur les NSC. La première est que la mélatonine agirait directement *via* ses récepteurs sur l'expression de *rorβ* engendrant par la suite le déphasage de *rev-erba*. La seconde hypothèse est que l'augmentation transitoire d'ARNm de *rorβ* ne serait pas responsable du déphasage du rythme d'expression de *rev-erba* mais que c'est une activation par phosphorylation de $ROR\alpha$ ou de l'un de ses co-activateurs qui serait responsable des effets mélatoninergiques observés. Cette partie aura donc pour but d'approfondir la cascade intracellulaire du message mélatoninergique jusqu'à *rev-erba* et *rorβ* dont l'impact de la phosphorylation de $ROR\alpha$, ainsi que celle de ses co-activateurs, suite à l'action de la mélatonine sur les NSC. Pour cela, deux approches parallèles doivent être pratiquées, l'approche *in vivo* consistera à étudier la réponse chez des souris ayant une invalidation de l'un des gènes impliqués dans les effets d'une injection de mélatonine (*mt₁*,

rev-erba, *rorβ* ou *rorα*). La seconde approche est *in vitro* nous permettra de contrôler de façon stricte l'ensemble des paramètres.

A. Étude *in vivo* : les conséquences d'une invalidation génique

Nous venons de montrer que les récepteurs orphelins sont les effecteurs précoces de la mélatonine dans les NSC. La possibilité d'utiliser des souches de souris ayant une invalidation de l'un des différents gènes : *rev-erba*, *rorβ*, *rorα* ou *mt₁* pourrait être crucial dans l'approfondissement de nos connaissances des effets de la mélatonine sur les NSC. Dans un premier temps, il sera nécessaire d'étudier la réponse de l'activité locomotrice de la souche sauvage afin de confirmer la présence chez cette espèce d'une avance de phase suite à une injection unique pharmacologique de mélatonine en fin de jour subjectif (CT 11.5). Pour cela, deux groupes des souris ayant le même background génétique que les souris mutées seront placés dans des cages individuelles munies d'une roue pendant plusieurs semaines (pour chaque condition) afin d'étudier leur comportement locomoteur d'abord en LD puis en DD. Ces souris sauvages seront ensuite injectées une demi heure avant le début de leur nuit subjective (CT 11.5) avec de la mélatonine (1 mg/kg) ou avec la solution ayant servi à la dissolution de l'hormone et nous observerons les effets sur le rythme d'activité locomotrice de ces souris. Ce même protocole sera ensuite répété pour chacune des souches ayant l'un des gènes d'intérêt muté. Les souches *staggerer* et *vacillans* présentent cependant des problèmes quant à la possibilité d'utiliser leur rythme d'activité locomotrice comme témoin de la rythmicité comportementale. En effet, l'invalidation du gène *rorα* induit une ataxie cérébelleuse et les animaux présentent des déficits majeurs pour l'activité locomotrice. De même, l'invalidation du gène *rorβ* provoque également des déficiences dans la locomotion. Il serait donc intéressant d'utiliser en parallèle un autre rythme comportemental tel que le rythme de la température corporelle. Pour cela les animaux seront implantés avec des capteurs de température au niveau abdominal.

Dans un second temps, une approche moléculaire sera pratiquée afin de confirmer l'implication potentielle des récepteurs orphelins dans les effets de la mélatonine sur l'horloge principale. Pour cela quatre groupes de souris seront utilisés : deux groupes de souris sauvages et deux groupes de souris mutantes ayant une injection de mélatonine ou de solution saline. Les animaux seront sacrifiés durant les 24 heures suivant l'injection de mélatonine. Nous récupérerons les coupes contenant les NSC mais également la PT. Les gènes que nous

avons ciblés sont tout d'abord le récepteur *mt₁* de la mélatonine afin de vérifier si l'effet de la mélatonine sur les récepteurs orphelins dans les NSC et la PT se fait *via* ce récepteur. Les conséquences d'une mutation de l'un des récepteurs orphelins seront par la suite étudiées afin de tenter de comprendre l'enchaînement des événements. L'étude à la fois comportementale et moléculaire de souches de souris présentant une invalidation de l'un de ces gènes nous permettra donc de confirmer ou d'infirmer l'implication de ces gènes dans les effets de la mélatonine sur les NSC et la PT. Enfin, il sera également nécessaire de définir quelle quantité de mélatonine atteint réellement les NSC suite à l'injection pharmacologique de mélatonine par un nouveau dosage tissulaire de la mélatonine autour des NSC suite à ce protocole d'injection.

B. Etude *in vitro* : les SCN 2.2

Afin d'approfondir la cascade transductionnelle de l'action mélatoninergique sur les NSC, il sera également nécessaire de poursuivre l'étude du mode d'action de la mélatonine sur les récepteurs orphelins par une approche *in vitro*. Cette perspective associe un modèle spécifique des mécanismes d'action intracellulaires de l'horloge et une approche nous permettant d'étudier directement les effets de la mélatonine dans les NSC. Ces travaux seront menés sur des cellules de SCN 2.2 qui proviennent d'une lignée immortalisée de NSC de rat et représentent un modèle de choix pour les travaux envisagés. En effet, ces cellules expriment à la fois les deux récepteurs fonctionnels de la mélatonine (Earnest et al., 1999a et 1999b ; Hurst et al., 2002a et 2002b), et l'ensemble des gènes participant à la genèse des oscillations circadiennes et qui présentent donc une rythmicité circadienne (Akashi and Takumi, 2005). La première étape sera d'entreprendre le clonage des promoteurs de *rev-erb α* , *ror β* ou *ror α* . Pour cela, les séquences prédictives des promoteurs des récepteurs orphelins chez le rat ont été déduites des séquences publiées dans la littérature. A partir de ces séquences théoriques, des amorces ont été modélisées et permettent par PCR, d'amplifier à partir d'ADN génomique, des séquences de 2000 pb. Les segments d'intérêt purifiés seront inclus dans un vecteur de clonage. Ces vecteurs devront alors être inclus dans une souche d'*E.coli* compétente. Les souches présentant le vecteur avec le fragment amplifié, seront sélectionnées pour permettre d'isoler un grand nombre de copies vectorielles puis la séquence nucléotidique de ces clones sera analysée afin de confirmer son identité. Par la suite, ces segments seront sous clonés dans des vecteurs d'expression couplés à la luciférase. Des cultures de SCN 2.2 seront transfectées avec ces différents vecteurs. Les cellules seront par la

suite traitées avec de la mélatonine, et l'expression de *rorβ*, *rev-erba* ainsi que celle de certains de leurs gènes cibles (ex : *bmal1*) seront analysées. En parallèle, une étude du rythme de phosphorylation de RORα pourrait être intéressante afin de confirmer ou d'infirmer le modèle décrit au cours de ma discussion. J'ai en effet supposé que la protéine RORα (ou l'un de ses partenaires) pourrait être responsable de l'activation transcriptionnelle des autres récepteurs orphelins, si tel est le cas nous pourrions par la suite approfondir l'étude de la cascade du message mélatoninergique. Pour cela, une étude du niveau de phosphorylation par la technique de gel en 2 dimensions pourra nous permettre d'identifier les protéines RORα phosphorylées et non phosphorylées. Enfin, si notre hypothèse se trouvait infirmée, nous pourrions étudier quelles sont les protéines qui se fixent sur le promoteur de *rev-erba* en présence de mélatonine. A partir de ce modèle, nous pourrions alors remonter la cascade moléculaire de transduction de l'information mélatoninergique. En conclusion, la mise en place et l'exploitation de ce modèle complet d'expérimentation permettra d'ouvrir de nouvelles pistes de travail pour caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires des effets chronobiotiques de la mélatonine sur le fonctionnement de l'horloge circadienne, ainsi que la signalisation intracellulaire entre les récepteurs MT₁ et/ou MT₂ et les gènes horloges, encore peu étudiée.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse montrent surtout la différence tissulaire qui existe dans la réponse mélatoninergique. En effet, on observe que les effets de la mélatonine qu'elle soit endogène ou exogène ont des conséquences différentes sur les rythmes d'expression des différents gènes horloges et des récepteurs orphelins suivant le tissu cérébral concerné. Il sera donc nécessaire d'étudier en parallèle les NSC et la PT pour les différents effets de la mélatonine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



-A-

- Abe, H., Honma, S., Namihira, M., Tanahashi, Y., Ikeda, M. and Honma, K. (1998). Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci Lett* 258, 93-96.
- Adelmant, G., Begue, A., Stehelin, D. and Laudet, V. (1996). A functional Rev-erb alpha responsive element located in the human Rev-erb alpha promoter mediates a repressing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3553-3558.
- Aguilar-Roblero, R., Drucker-Colin, R. and Moore, R.Y. (1992). Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN-lesioned rats. *Chronobiol Int* 9, 278-296.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. and 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.
- Akashi, M. and Takumi, T. (2005). The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12, 441-448.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y. and Shibata, S. (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci* 19, 1115-1121.
- Albers, H.E., Stopa, E.G., Zoeller, R.T., Kauer, J.S., King, J.C., Fink, J.S., Mobtaker, H. and Wolfe, H. (1990). Day-night variation in prepro vasoactive intestinal peptide/peptide histidine isoleucine mRNA within the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 7, 85-89.
- Albers, H.E., Liou, S.Y., Stopa, E.G. and Zoeller, R.T. (1991). Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J Neurosci* 11, 846-851.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G. and Lee, C.C. (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, Z.S. and Lee, C.C. (2001). MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* 16, 100-104.
- Andre, E., Conquet, F., Steinmayr, M., Stratton, S.C., Porciatti, V. and Becker-Andre, M. (1998a). Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J* 17, 3867-3877.
- Andre, E., Gawlas, K. and Becker-Andre, M. (1998b). A novel isoform of the orphan nuclear receptor RORbeta is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 216, 277-283.
- Andrews, W.V. and Conn, P.M. (1986). Gonadotropin-releasing hormone stimulates mass changes in phosphoinositides and diacylglycerol accumulation in purified gonadotrope cell cultures. *Endocrinology* 118, 1148-1158.
- Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H. and Takahashi, J.S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655-667.
- Arendt J. (1999). Jet-lag and shift work: (2). Therapeutic use of melatonin. *J R Soc Med.* 92, 402-5.
- Armstrong, S.M., Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Redman, J.R. and Short, R.V. (1986). Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm Suppl* 21, 375-394.
- Aschoff, J., Fatranska, M., Giedke, H., Doerr, P., Stamm, D. and Wisser, H. (1971). Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. *Science* 171, 213-215.
- Atkins, G.B., Hu, X., Guenther, M.G., Rachez, C., Freedman, L.P. and Lazar, M.A. (1999). Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol* 13, 1550-1557.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J. and Herzog, E.D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8, 476-483.
- Aust, S., Thalhammer, T., Humpeler, S., Jager, W., Klimpfner, M., Tucek, G., Obrist, P., Marktl, W.,

Penner, E. and Ekmekcioglu, C. (2004). The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res* 36, 43-48.

Austin, S., Medvedev, A., Yan, Z.H., Adachi, H., Hirose, T. and Jetten, A.M. (1998). Induction of the nuclear orphan receptor RORgamma during adipocyte differentiation of D1 and 3T3-L1 cells. *Cell Growth Differ* 9, 267-276.

-B-

Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525-536.

Baker, B.L., Dermody, W.C. and Reel, J.R. (1975). Distribution of gonadotropin-releasing hormone in the rat brain as observed with immunocytochemistry. *Endocrinology* 97, 125-135.

Baler, R., Coon, S. and Klein, D.C. (1996). Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 975-978.

Baler, R., Covington, S. and Klein, D.C. (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. and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937.

Banner, C.D., Gottlicher, M., Widmark, E., Sjoval, J., Rafter, J.J. and Gustafsson, J.A. (1993). A systematic analytical chemistry/cell assay approach to isolate activators of orphan nuclear receptors from biological extracts: characterization of peroxisome proliferator-activated receptor activators in plasma. *J Lipid Res* 34, 1583-1591.

Barnes, J.W., Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Mitchell, J.W., Burgoon, P.W., Hickok, J.R. and Gillette, M.U. (2003). Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science* 302, 439-442.

Barrett, P., Conway, S., Jockers, R., Strosberg, A.D., Guardiola-Lemaitre, B., Delagrè, P. and Morgan, P.J. (1997). Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1356, 299-307.

Becker-Andre, M., Wiesenberger, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J.H. and Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone

melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269, 28531-28534.

Benbrook, D. and Pfahl, M. (1987). A novel thyroid hormone receptor encoded by a cDNA clone from a human testis library. *Science* 238, 788-791.

Benlucif, S. and Dubocovich, M.L. (1996). Melatonin and light induce phase shifts of circadian activity rhythms in the C3H/HeN mouse. *J Biol Rhythms* 11, 113-125.

Bergmann, M., Wittkowski, W. and Hoffmann, K. (1989). Ultrastructural localization of thyrotropin (TSH)-like immunoreactivity in specific secretory cells of the hypophyseal pars tuberalis in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 256, 649-652.

Berry, M., Sievers, J. and Baumgarten, H.G. (1980). Adaptation of the cerebellum to deafferentation. *Prog Brain Res* 53, 65-92.

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

Bittman, E.L., Dempsey, R.J. and Karsch, F.J. (1983). Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113, 2276-2283.

Block, C.H., Santos, R.A., Brosnihan, K.B. and Ferrario, C.M. (1988). Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides* 9, 1395-1401.

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

Bock, N., Bockers, T.M., Bockmann, J., Nowak, P., Buse, E. and Wittkowski, W. (2001). The Pars tuberalis of the monkey (*Macaca fascicularis*) hypophysis: cell types and hormone expression. *Cells Tissues Organs* 169, 55-63.

Bockers, T.M., Bockmann, J., Fauteck, J.D., Kreutz, M.R., Bock, R. and Wittkowski, W. (1994). Pars tuberalis-specific cells in the ovine pituitary do express the common alpha-chain of glycoprotein hormones: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Eur J Endocrinol* 131, 540-546.

- Bockers, T.M., Niklowitz, P., Bockmann, J., Fauteck, J.D., Wittkowski, W. and Kreutz, M.R. (1995). Daily melatonin injections induce cytological changes in pars tuberalis-specific cells similar to short photoperiod. *J Neuroendocrinol* 7, 607-613.
- Bockers, T.M., Bockmann, J., Fauteck, J.D., Wittkowski, W., Sabel, B.A. and Kreutz, M.R. (1996). Evidence for gene transcription of adenohipophyseal hormones in the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 63, 16-27.
- Bockmann, J., Bockers, T.M., Vennemann, B., Niklowitz, P., Muller, J., Wittkowski, W., Sabel, B. and Kreutz, M.R. (1996). Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* 137, 1804-1813.
- Bockmann, J., Kreutz, M.R., Wittkowski, W. and Bockers, T.M. (1997). TSH expression in murine hypophyseal pars tuberalis-specific cells. *Acta Anat (Basel)* 160, 189-194.
- Boer, G.J., van Esseveldt, K.E., van der Geest, B.A., Duindam, H. and Rietveld, W.J. (1999). Vasopressin-deficient suprachiasmatic nucleus grafts re-instate circadian rhythmicity in suprachiasmatic nucleus-lesioned arrhythmic rats. *Neuroscience* 89, 375-385.
- Bonnelye, E., Vanacker, J.M., Desbiens, X., Begue, A., Stehelin, D. and Laudet, V. (1994). Rev-erb beta, a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. *Cell Growth Differ* 5, 1357-1365.
- Bothorel, B., Barassin, S., Saboureaux, M., Perreau, S., Vivien-Roels, B., Malan, A. and 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.
- Braissant, O., Fufelle, F., Scotto, C., Dauca, M. and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354-366.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D. and Jockers, R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13, 2025-2038.
- Brydon, L., Petit, L., Delagrang, P., Strosberg, A.D. and Jockers, R. (2001). Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 142, 4264-4271.
- Buijs, R.M. (1996). The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res* 111, 229-240.
- Burrows, H., Douglas, K., Seasholtz, A. and Camper, S. (1999). Genealogy of the Anterior Pituitary Gland: Tracing a Family Tree. *Trends Endocrinol Metab* 10, 343-352.
- Butcher, G.Q., Lee, B., Hsieh, F. and Obrietan, K. (2004). Light- and clock-dependent regulation of ribosomal S6 kinase activity in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 19, 907-915.
- C-
- Cagampang, F.R., Yang, J., Nakayama, Y., Fukuhara, C. and Inouye, S.T. (1994). Circadian variation of arginine-vasopressin messenger RNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 24, 179-184.
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z. and Keesler, G.A. (2001). Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett* 489, 159-165.
- Campbell, S.S. and Murphy, P.J. (1998). Extraocular circadian phototransduction in humans. *Science* 279, 396-399.
- Canaple, L., Rambaud, J., Dkhissi-Benyahya, O., Rayet, B., Tan, N.S., Michalik, L., Delaunay, F., Wahli, W. and Laudet, V. (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol Endocrinol* 20, 1715-1727.
- Card, J.P., Brecha, N., Karten, H.J. and Moore, R.Y. (1981). Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1, 1289-1303.
- Cardinali, D.P., Nagle, C.A. and Rosner, J.M. (1974). Periodic changes in rat retinal and pineal melatonin synthesis. *Acta Physiol Lat Am* 24, 97-98.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J.K., DeLamar, J.F. and Becker-Andre, M. (1994). RZR, a new family of retinoid-related orphan

receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 8, 757-770.

Carlberg, C. and Wiesenberger, I. (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 18, 171-178.

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J. and Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.

Cassone, V.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 13, 457-464.

Cassone, V.M., Chesworth, M.J. and Armstrong, S.M. (1986). Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J Biol Rhythms* 1, 219-229.

Cegielska, A., Gietzen, K.F., Rivers, A. and Virshup, D.M. (1998). Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J Biol Chem* 273, 1357-1364.

Cermakian, N., Monaco, L., Pando, M.P., Dierich, A. and Sassone-Corsi, P. (2001). Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J* 20, 3967-3974.

Challet, E., Pevet, P. and Malan, A. (1996). Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci Lett* 216, 214-218.

Challet, E., Pevet, P., Vivien-Roels, B. and Malan, A. (1997a). Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12, 65-79.

Challet, E., Pevet, P. and Malan, A. (1997b). Lesion of the serotonergic terminals in the suprachiasmatic nuclei limits the phase advance of body temperature rhythm in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12, 235-244.

Chang, J.P., McCoy, E.E., Graeter, J., Tasaka, K. and Catt, K.J. (1986). Participation of voltage-dependent calcium channels in the action of gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 261, 9105-9108.

Chauvet, C., Bois-Joyeux, B. and Danan, J.-L. (2002). Retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) alpha4 is the predominant isoform of

the nuclear receptor RORalpha in the liver and is up-regulated by hypoxia in HepG2 human hepatoma cells. *Biochem J* 364, 449-456.

Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M. and Zhou, Q.-Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405-410.

Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Huang, Y., Lewis, W., He, N.u., Evans, R.M., Schneider, M.D., Brako, F.A., Xiao, Y., Chen, Y.E. and Yang, Q. (2004). Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med* 10, 1245-1250.

Cheng, M.Y., Bittman, E.L., Hattar, S. and Zhou, Q.-Y. (2005). Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci* 6.17.

Chomez, P., Neveu, I., Mansen, A., Kiesler, E., Larsson, L., Vennstrom, B. and Arenas, E. (2000). Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA(alpha) orphan receptor. *Development* 127, 1489-1498.

Chow, L., Levine, E.M. and Reh, T.A. (1998). The nuclear receptor transcription factor, retinoid-related orphan receptor beta, regulates retinal progenitor proliferation. *Mech Dev* 77, 149-164.

Chucharoen, P., Chetsawang, B., Srikiatkachorn, A. and Govitrapong, P. (2003). Melatonin receptor expression in rat cerebral artery. *Neurosci Lett* 341, 259-261.

Clapper, D.L. and Conn, P.M. (1985). Gonadotropin-releasing hormone stimulation of pituitary gonadotrope cells produces an increase in intracellular calcium. *Biol Reprod* 32, 269-278.

Colwell, C.S., Ralph, M.R. and Menaker, M. (1990). Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior?. *Brain Res* 523, 117-120.

Conway, S., Drew, J.E., Mowat, E.S., Barrett, P., Delagrange, P. and Morgan, P.J. (2000). Chimeric melatonin mtl and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mtl receptor. *J Biol Chem* 275, 20602-20609.

Cornelius, P., MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1994). Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14, 99-129.

- Coste, H. and Rodriguez, J.C. (2002). Orphan nuclear hormone receptor Rev-erb α regulates the human apolipoprotein CIII promoter. *J Biol Chem* 277, 27120-27129.
- Costet, P., Legendre, C., More, J., Edgar, A., Galtier, P. and Pineau, T. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* 273, 29577-29585.
- Csaki, A., Kocsis, K., Halasz, B. and Kiss, J. (2000). Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [3H]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience* 101, 637-655.
- Cui, L.N., Coderre, E. and Renaud, L.P. (2000). GABA(B) presynaptically modulates suprachiasmatic input to hypothalamic paraventricular magnocellular neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R1210-6.
- Cutler, D.J., Haraura, M., Reed, H.E., Shen, S., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Marston, H.M., Harmar, A.J. and Piggins, H.D. (2003). The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *Eur J Neurosci* 17, 197-204.
- Cutler, R.A., Kalsbeek, A. and Pevet, P. (1994). 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.
- CZYBA, J.C., GIROD, C. and DURAND, N. (1964). [ON EPIPHYSO-HYPOPHYSIAL ANTAGONISM AND SEASONAL SPERMATOGENESIS VARIATIONS IN THE GOLD HAMSTER (MESOCRICETUS AURATUS)]. *J. C R Seances Soc Biol Fil* 158, 742-745.
- D-**
- Daikoku, S., Okamura, Y., Kawano, H., Tsuruo, Y., Maegawa, M. and Shibasaki, T. (1985). CRF-containing neurons of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 240, 575-584.
- Daniolos, A., Lerner, A.B. and Lerner, M.R. (1990). Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res* 3, 38-43.
- Dardente, H., Klosen, P., Pevet, P. and Masson-Pevet, M. (2003a). MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* 15, 778-786.
- Dardente, H., Menet, J.S., Poirel, V.J., Streicher, D., Gauer, F., Vivien-Roels, B., Klosen, P., Pevet, P. and Masson-Pevet, M. (2003b). Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 114, 101-106.
- Delaunay, F. and Laudet, V. (2002). Circadian clock and microarrays: mammalian genome gets rhythm. *Trends Genet* 18, 595-597.
- Delerive, P., Chin, W.W. and Suen, C.S. (2002). Identification of Rev-erb(α) as a novel ROR(α) target gene. *J Biol Chem* 277, 35013-35018.
- Desvergne, B. and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-688.
- Ding, J.M., Chen, D., Weber, E.T., Faiman, L.E., Rea, M.A. and Gillette, M.U. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713-1717.
- Djeridane, Y., Vivien-Roels, B., Simonneaux, V., Miguez, J.M. and Pevet, P. (1998). Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. *J Pineal Res* 25, 54-64.
- Doi, M., Hirayama, J. and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125, 497-508.
- Doulazmi, M., Frederic, F., Capone, F., Becker-Andre, M., Delhay-Bouchaud, N. and Mariani, J. (2001). A comparative study of Purkinje cells in two ROR α gene mutant mice: staggerer and ROR α (-/-). *Brain Res Dev Brain Res* 127, 165-174.
- Drew, J.E., Williams, L.M., Hannah, L.T., Barrett, P. and Abramovich, D.R. (1998). Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J Endocrinol* 156, 261-267.
- Drew, J.E., Barrett, P., Mercer, J.G., Moar, K.M., Canet, E., Delagrange, P. and Morgan, P.J. (2001). Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 13, 453-458.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992). Control of the

peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879-887.

Drijfhout, W.J., van der Linde, A.G., de Vries, J.B., Grol, C.J. and Westerink, B.H. (1996). Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* 202, 185-188.

Dubocovich, M.L. (1988). Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 2, 2765-2773.

Dubocovich, M.L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends Pharmacol Sci* 16, 50-56.

Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benlucif, S. and Masana, M.I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 12, 1211-1220.

Dubocovich, M.L., Hudson, R.L., Sumaya, I.C., Masana, M.I. and Manna, E. (2005). Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* 39, 113-120.

Dumas, B., Harding, H.P., Choi, H.S., Lehmann, K.A., Chung, M., Lazar, M.A. and Moore, D.D. (1994). A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol Endocrinol* 8, 996-1005.

Duncan, M.J. and Goldman, B.D. (1984). Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. II. Role of prolactin. *J Exp Zool* 230, 97-103.

Duncan, M.J., Takahashi, J.S. and Dubocovich, M.L. (1988). 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122, 1825-1833.

Dussault, I., Fawcett, D., Matthyssen, A., Bader, J.A. and Giguere, V. (1998). Orphan nuclear receptor ROR alpha-deficient mice display the cerebellar defects of staggerer. *Mech Dev* 70, 147-153.

-E-

Earnest, D.J., DiGiorgio, S. and Olschowka, J.A. (1993). Light induces expression of fos-related proteins within gastrin-releasing peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 627, 205-209.

Earnest, D.J., Liang, F.Q., Ratcliff, M. and Cassone, V.M. (1999a). Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science* 283, 693-695.

Earnest, D.J., Liang, F.Q., DiGiorgio, S., Gallagher, M., Harvey, B., Earnest, B. and Seigel, G. (1999b). Establishment and characterization of adenoviral E1A immortalized cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurobiol* 39, 1-13.

Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R. and Reppert, S.M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6133-6137.

Edelstein, K. and Amir, S. (1999). The intergeniculate leaflet does not mediate the disruptive effects of constant light on circadian rhythms in the rat. *Neuroscience* 90, 1093-1101.

Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A. and Virshup, D.M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 277, 17248-17254.

Emery, P. and Reppert, S.M. (2004). A rhythmic Ror. *Neuron* 43, 443-446.

Enmark, E., Kainu, T., Pelto-Huikko, M. and Gustafsson, J.A. (1994). Identification of a novel member of the nuclear receptor superfamily which is closely related to Rev-ErbA. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 49-56.

Etchegaray, J.-P., Lee, C., Wade, P.A. and Reppert, S.M. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421, 177-182.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

-F-

Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M. and Hastings, M.H. (2000). Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* 25, 437-447.

Flotow, H. and Roach, P.J. (1991). Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J Biol Chem* 266, 3724-3727.

Forman, B.M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S.A., Henshaw, R., Ong, E.S. and Evans, R.M. (1994). Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 8, 1253-1261.

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

Foster, R.G. and Hankins, M.W. (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res* 21, 507-527.

Fredenrich, A. and Grimaldi, P.A. (2004). Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta in skeletal muscle function and adaptation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 377-381.

Fruchart, J.C., Duriez, P. and Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10, 245-257.

Fujieda, H., Hamadanizadeh, S.A., Wankiewicz, E., Pang, S.F. and Brown, G.M. (1999). Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* 93, 793-799.

Fukuhara, C., Nishiwaki, T., Cagampang, F.R. and Inouye, S.T. (1994). Emergence of VIP rhythmicity following somatostatin depletion in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 645, 343-346.

Fukuhara, C., Suzuki, N., Matsumoto, Y., Nakayama, Y., Aoki, K., Tsujimoto, G., Inouye, S.I. and Masuo, Y. (1997). Day-night variation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 229, 49-52.

-G-

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

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

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

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

Gauer, F., Masson-Pevet, M. and Pevet, P. (1994b). The NMDA antagonist MK-801 blocks light effect on melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett* 171, 24-26.

Gauer, F. and Craft, C.M. (1996). Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res* 737, 99-109.

Gauer, F., Schuster, C., Poirel, V.J., Pevet, P. and Masson-Pevet, M. (1998). Cloning experiments and developmental expression of both melatonin receptor Mel1A mRNA and melatonin binding sites in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res* 60, 193-202.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. and Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-1569.

Gervois, P., Torra, I.P., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2000). Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* 38, 3-11.

Gibbons, G.F., Patel, D., Wiggins, D. and Knight, B.L. (2002). The functional efficiency of lipogenic and cholesterologenic gene expression in normal mice and in mice lacking the peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha). *Adv Enzyme Regul* 42, 227-247.

Gietzen, K.F. and Virshup, D.M. (1999). Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J Biol Chem* 274, 32063-32070.

Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M. and Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 8, 538-553.

Giguere, V., McBroom, L.D. and Flock, G. (1995). Determinants of target gene specificity for ROR

- alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol* 15, 2517-2526.
- Gillette, M.U. and McArthur, A.J. (1996). Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behav Brain Res* 73, 135-139.
- Godson, C. and Reppert, S.M. (1997). The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397-404.
- Goldman, B., Hall, V., Hollister, C., Roychoudhury, P., Tamarkin, L. and Westrom, W. (1979). Effects of melatonin on the reproductive system in intact and pinealectomized male hamster maintained under various photoperiods. *Endocrinology* 104, 82-88.
- Goldman, B.D. and Darrow, J.M. (1983). The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology* 37, 386-396.
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E. and Saper, C.B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4, 1165.
- Gorczyca, W.A., Polans, A.S., Surgucheva, I.G., Subbaraya, I., Baehr, W. and Palczewski, K. (1995). Guanylyl cyclase activating protein. A calcium-sensitive regulator of phototransduction. *J Biol Chem* 270, 22029-22036.
- Gotter, A.L., Manganaro, T., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F.J., Possidente, B., Sriram, S., MacLaughlin, D.T. and Reppert, S.M. (2000). A time-less function for mouse timeless. *Nat Neurosci* 3, 755-756.
- Gotter, A.L. (2006). A Timeless debate: resolving TIM's noncircadian roles with possible clock function. *Neuroreport* 17, 1229-1233.
- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q. and Gustafsson, J.A. (1992). Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4653-4657.
- Graves, P.R. and Roach, P.J. (1995). Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* 270, 21689-21694.
- Green, S. and Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 4, 309-314.
- Greiner, E.F., Kirfel, J., Greschik, H., Dorflinger, U., Becker, P., Mercep, A. and Schule, R. (1996). Functional analysis of retinoid Z receptor beta, a brain-specific nuclear orphan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10105-10110.
- Groblewski, T.A., Nunez, A.A. and Gold, R.M. (1981). Circadian rhythms in vasopressin deficient rats. *Brain Res Bull* 6, 125-130.
- Gross, D.S. (1983). Hormone production in the hypophysial pars tuberalis of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 112, 733-744.
- Gross, D.S. (1984). The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 56, 283-298.
- Gross, S.D. and Anderson, R.A. (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* 10, 699-711.
- Gubitz, A.K. and Reppert, S.M. (1999). Assignment of the melatonin-related receptor to human chromosome X (GPR50) and mouse chromosome X (Gpr50). *Genomics* 55, 248-251.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. and Shiekhata, R. (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* 14, 1048-1057.
- Guenther, M.G., Barak, O. and Lazar, M.A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 21, 6091-6101.
- Guerra, M. and Rodriguez, E.M. (2001). Identification, cellular and subcellular distribution of 21 and 72 kDa proteins (tuberalins?) secreted by specific cells of the pars tuberalis. *J Endocrinol* 168, 363-379.
- Guerrero, H.Y., Gauer, F., Schuster, C., Pevet, P. and Masson-Pevet, M. (2000). Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 71, 163-169.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V. and Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20, 391-403.
- Guldner, F.H. and Wolff, J.R. (1996). Complex synaptic arrangements in the rat suprachiasmatic nucleus: a possible basis for the "Zeitgeber" and non-

synaptic synchronization of neuronal activity. *Cell Tissue Res* 284, 203-214.

-H-

Hamada, T., Shibata, S., Tsuneyoshi, A., Tominaga, K. and Watanabe, S. (1993). Effect of somatostatin on circadian rhythms of firing and 2-deoxyglucose uptake in rat suprachiasmatic slices. *Am J Physiol* 265, R1199-204.

Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Gillette, M.U. and Mikkelsen, J.D. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 17, 2637-2644.

Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309, 73-88.

Hannibal, J., Hindeross, P., Knudsen, S.M., Georg, B. and 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.

Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T. and Fukada, Y. (2005). Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 280, 31714-31721.

Harding, H.P. and Lazar, M.A. (1995). The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol* 15, 4791-4802.

Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.C., Kelly, J.S., Maywood, E.S. and Hastings, M.H. (2002). The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497-508.

Harrington, M.E. and Hoque, S. (1997). NPY opposes PACAP phase shifts via receptors different from those involved in NPY phase shifts. *Neuroreport* 8, 2677-2680.

Hastings, M.H., Field, M.D., Maywood, E.S., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1999). Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci* 19.

Hastings, M.H., Duffield, G.E., Smith, E.J., Maywood, E.S. and Ebling, F.J. (1998). Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol Int* 15, 425-445.

Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M. and Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070.

Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R.H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R.G. and Yau, K.W. (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76-81.

Hazlerigg, D.G., Gonzalez-Brito, A., Lawson, W., Hastings, M.H. and Morgan, P.J. (1993). Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 132, 285-292.

Hazlerigg, D.G., Hastings, M.H. and Morgan, P.J. (1994). The recovery of ovine pars tuberalis cells from melatonin-induced sensitization is a slow, protein synthesis-dependent phenomenon. *J Endocrinol* 142, 127-138.

Hazlerigg, D.G., Barrett, P., Hastings, M.H. and Morgan, P.J. (1996). Are nuclear receptors involved in pituitary responsiveness to melatonin? *Mol Cell Endocrinol* 123, 53-59.

Hermes, M.L., Coderre, E.M., Buijs, R.M. and Renaud, L.P. (1996). GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol* 496 (Pt 3), 749-757.

Heward, C.B. and Hadley, M.E. (1975). Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines. *Life Sci* 17, 1167-1177.

Hey, P.J., Twells, R.C., Phillips, M.S., Brown, S.D., Kawaguchi, Y., Cox, R., Dugan, V., Hammond, H., Metzker, M.L., Todd, J.A. and Hess, J.F. (1998). Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* 216, 103-111.

Hirose, T., Smith, R.J. and Jetten, A.M. (1994). ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1976-1983.

- Ho, A.K., Thomas, T.P., Chik, C.L., Anderson, W.B. and Klein, D.C. (1988). Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca^{2+} influx. Evidence that Ca^{2+} -dependent subcellular redistribution of protein kinase C is involved in potentiation of beta-adrenergic stimulation of pineal cAMP and cGMP by K^{+} and A23187. *J Biol Chem* 263, 9292-9297.
- Hochstetler, K.J., Garland, T.J., Swallow, J.G., Carter, P.A. and Bult-Ito, A. (2004). Number of arginine-vasopressin neurons in the suprachiasmatic nuclei is not related to level or circadian characteristics of wheel-running activity in house mice. *Behav Genet* 34, 131-136.
- Hoffman, R.A. and Reiter, R.J. (1965). Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec* 153, 19-21.
- Hoffmann, B. (1973). [Laboratory methods and organizational aspects of serological tests for syphilis in the light of discussions at the International Round Table Conference]. *Przegl Dermatol* 0, 15-21.
- Hoffmann, B. (1979). Aspects on the formation and detection of tissue levels of anabolic steroids in domestic animals. *J Steroid Biochem* 11, 919-922.
- Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H. and Bradfield, C.A. (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, J.B., Gu, Y.Z., Jain, S. and Bradfield, C.A. (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. and 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., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y. and Honma, K.-i. (2002). Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419, 841-844.
- Hosoda, H., Motohashi, J., Kato, H., Masushige, S. and Kida, S. (2004). A BMAL1 mutant with arginine 91 substituted with alanine acts as a dominant negative inhibitor. *Gene* 338, 235-241.
- Hsu, M.H., Palmer, C.N., Song, W., Griffin, K.J. and Johnson, E.F. (1998). A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem* 273, 27988-27997.
- Hu, E., Tontonoz, P. and Spiegelman, B.M. (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9856-9860.
- Hu, X. and Lazar, M.A. (2000). Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11, 6-10.
- Hu, X., Li, Y. and Lazar, M.A. (2001). Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21, 1747-1758.
- Huckle, W.R. and Conn, P.M. (1987). The relationship between gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release and inositol phosphate production: studies with calcium antagonists and protein kinase C activators. *Endocrinology* 120, 160-169.
- Huckle, W.R. and Conn, P.M. (1988). Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone action. II. The effector system. *Endocr Rev* 9, 387-395.
- Huhman, K.L., Hennessey, A.C. and Albers, H.E. (1996). Rhythms of glutamic acid decarboxylase mRNA in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 11, 311-316.
- Humlova, M. and Illnerova, H. (1990). Melatonin entrains the circadian rhythm in the rat pineal N-acetyltransferase activity. *Neuroendocrinology* 52, 196-199.
- Hunt, A.E., Al-Ghoul, W.M., Gillette, M.U. and Dubocovich, M.L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C110-8.
- Hurst, W.J., Earnest, D. and Gillette, M.U. (2002a). Immortalized suprachiasmatic nucleus cells express components of multiple circadian regulatory pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 20-30.
- Hurst, W.J., Mitchell, J.W. and Gillette, M.U. (2002b). Synchronization and phase-resetting by

glutamate of an immortalized SCN cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 133-143.

-I-

Ibata, Y., Takahashi, Y., Okamura, H., Kawakami, F., Terubayashi, H., Kubo, T. and Yanaihara, N. (1989). Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neurosci Lett* 97, 1-5.

Illnerova, H. and Vanecek, J. (1980). Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of a year. *Neuroendocrinology* 31, 321-326.

Ingram, C.D., Snowball, R.K. and Mihai, R. (1996). Circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus slices from the vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Neuroscience* 75, 635-641.

Ingram, C.D., Ciobanu, R., Coculescu, I.L., Tanasescu, R., Coculescu, M. and Mihai, R. (1998). Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res* 119, 351-364.

Inoue, I., Shinoda, Y., Ikeda, M., Hayashi, K., Kanazawa, K., Nomura, M., Matsunaga, T., Xu, H., Kawai, S., Awata, T., Komoda, T. and Katayama, S. (2005). CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *J Atheroscler Thromb* 12, 169-174.

Inouye, S.T. and Shibata, S. (1994). Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res* 20, 109-130.

Ishida, Y., Yagita, K., Fukuyama, T., Nishimura, M., Nagano, M., Shigeyoshi, Y., Yamaguchi, S., Komori, T. and Okamura, H. (2001). Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iepsilon and Idelta mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 64, 612-616.

Ishizuka, T. and Lazar, M.A. (2003). The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* 23, 5122-5131.

Isobe, Y. and Nishino, H. (1996). Vasoactive intestinal peptide and gastrin-releasing peptide play distinct roles in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 40, 287-290.

Iuvone, P.M. and Gan, J. (1994). Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *J Neurochem* 63, 118-124.

Iuvone, P.M. and Gan, J. (1995). Functional interaction of melatonin receptors and D1 dopamine receptors in cultured chick retinal neurons. *J Neurosci* 15, 2179-2185.

Iwahana, E., Akiyama, M., Miyakawa, K., Uchida, A., Kasahara, J., Fukunaga, K., Hamada, T. and Shibata, S. (2004). Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 19, 2281-2287.

Izumi, S., Stojilkovic, S.S. and Catt, K.J. (1989). Calcium mobilization and influx during the biphasic cytosolic calcium and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Arch Biochem Biophys* 275, 410-428.

-J-

Jilg, A., Moek, J., Weaver, D.R., Korf, H.-W., Stehle, J.H. and von Gall, C. (2005). Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur J Neurosci* 22, 2845-2854.

Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., de Vries, G.J. and Reppert, S.M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68.

Jin, X., von Gall, C., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., Stehle, J.H., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2003). Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23, 1054-1060.

Jockers, R., Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Barrett, P., Morgan, P.J., Guardiola, B., Delagrè, P., Marullo, S. and Strosberg, A.D. (1997). Novel isoforms of Mel1c melatonin receptors modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels. *Mol Endocrinol* 11, 1070-1081.

Johnston, J.D., Tournier, B.B., Andersson, H., Masson-Pévet, M., Lincoln, G.A. and Hazlerigg, D.G. (2006). Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology* 147, 959-965.

Juge-Aubry, C.E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Burger, A.G. and Meier, C.A. (1999). Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome

proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 274, 10505-10510.

-K-

Kallen, J.A., Schlaeppli, J.-M., Bitsch, F., Geisse, S., Geiser, M., Delhon, I. and Fournier, B. (2002). X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure* 10, 1697-1707.

Kallen, J., Schlaeppli, J.-M., Bitsch, F., Filipuzzi, I., Schilb, A., Riou, V., Graham, A., Strauss, A., Geiser, M. and Fournier, B. (2004). Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem* 279, 49330-49337.

Kalsbeek, A., Cutrera, R.A., Van Heerikhuizen, J.J., Van Der Vliet, J. and Buijs, R.M. (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. and Buijs, R.M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309, 109-118.

Kane, C.D. and Means, A.R. (2000). Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *EMBO J* 19, 691-701.

Kao, J.P., Harootunian, A.T. and Tsien, R.Y. (1989). Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 264, 8179-8184.

Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J. and Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 40, 185-232.

Karsch, F.J., Malpoux, B., Wayne, N.L. and Robinson, J.E. (1988). Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 28, 459-472.

Kassam, A., Capone, J.P. and Rachubinski, R.A. (1999). Orphan nuclear hormone receptor

RevErbalpha modulates expression from the promoter of the hydratase-dehydrogenase gene by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent transactivation. *J Biol Chem* 274, 22895-22900.

Keesler, G.A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D., Mondadori, C. and Yao, Z. (2000). Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport* 11, 951-955.

Kennaway, D.J. and Hugel, H.M. (1992). Melatonin binding sites: are they receptors?. *Mol Cell Endocrinol* 88, C1-9.

Kilcoyne, M.M., Hoffman, D.L. and Zimmerman, E.A. (1980). Immunocytochemical localization of angiotensin II and vasopressin in rat hypothalamus: evidence for production in the same neuron. *Clin Sci (Lond)* 59 Suppl 6, 57s-60s.

Kim, Y.I. and Dudek, F.E. (1992). Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: inhibitory synaptic mechanisms. *J Physiol* 458, 247-260.

King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-653.

Klein, D.C. and Weller, J. (1970). Input and output signals in a model neural system: the regulation of melatonin production in the pineal gland. *In Vitro* 6, 197-204.

Klein, D.C., Buda, M.J., Kapoor, C.L. and 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, D.C. and Moore, R.Y. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174, 245-262.

Klein, D.C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 117, 38-56.

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM,

- Cassone VM, Baler R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52,307-57; discussion 357-8.
- Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7355-7359.
- Klosen, P., Bienvenu, C., Demartean, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pevet, P. and Masson-Pevet, M. (2002). The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem* 50, 1647-1657.
- Ko, C.H. and Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R271-7.
- Koike, N., Hida, A., Numano, R., Hirose, M., Sakaki, Y. and Tei, H. (1998). Identification of the mammalian homologues of the *Drosophila* timeless gene, *Timeless1*. *FEBS Lett* 441, 427-431.
- Kokkola, T., Watson, M.A., White, J., Dowell, S., Foord, S.M. and Laitinen, J.T. (1998). Mutagenesis of human *Mell1a* melatonin receptor expressed in yeast reveals domains important for receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 531-536.
- Kokkola, T. and Laitinen, J.T. (1998). Melatonin receptor genes. *Ann Med* 30, 88-94.
- Kopp, M.D., Schomerus, C., Dehghani, F., Korf, H.W. and Meissl, H. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *J Neurosci* 19, 206-219.
- Korf, H.W., Schomerus, C., Maronde, E. and Stehle, J.H. (1996). Signal transduction molecules in the rat pineal organ: Ca²⁺, pCREB, and ICER. *Naturwissenschaften* 83, 535-543.
- Kruisbrink, J., Mirmiran, M., Van der Woude, T P and Boer, G.J. (1987). Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat. *Brain Res* 419, 76-86.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. and Reppert, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.
- Kurebayashi, S. and Hirose, T. (1998). [Novel orphan receptor: ROR gamma expressed during adipocyte differentiation]. *Nippon Rinsho* 56, 1729-1733.
- L-**
- Laitinen, S. and Staels, B. (2003). Potential roles of ROR-alpha in cardiovascular endocrinology. *Nucl Recept Signal* 1.
- Laitinen, S., Fontaine, C., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2005). The role of the orphan nuclear receptor Rev-Erb alpha in adipocyte differentiation and function. *Biochimie* 87, 21-25.
- Larsen, P.J. (1999). Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* 46, 296-304.
- Larsen, P.J., Vrang, N., Moller, M., Jessop, D.S., Lightman, S.L., Chowdrey, H.S. and Mikkelsen, J.D. (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.
- Latruffe, N., Cherkaoui Malki, M., Nicolas-Frances, V., Clemencet, M.C., Jannin, B. and Berlot, J.P. (2000). Regulation of the peroxisomal beta-oxidation-dependent pathway by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and kinases. *Biochem Pharmacol* 60, 1027-1032.
- Laudet, V., Begue, A., Henry-Duthoit, C., Joubel, A., Martin, P., Stehelin, D. and Saule, S. (1991). Genomic organization of the human thyroid hormone receptor alpha (c-erbA-1) gene. *Nucleic Acids Res* 19, 1105-1112.
- Laura, R.P., Dizhoor, A.M. and Hurley, J.B. (1996). The membrane guanylyl cyclase, retinal guanylyl cyclase-1, is activated through its intracellular domain. *J Biol Chem* 271, 11646-11651.
- Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S. and Chin, W.W. (1989a). A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol* 9, 1128-1136.
- Lazar, M.A., Hodin, R.A. and Chin, W.W. (1989b). Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-

- erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7771-7774.
- Leak, R.K., Card, J.P. and Moore, R.Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res* 819, 23-32.
- Leak, R.K. and Moore, R.Y. (2001). Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 433, 312-334.
- Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S. and Reppert, S.M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867.
- Lemberger, T., Braissant, O., Juge-Aubry, C., Keller, H., Saladin, R., Staels, B., Auwerx, J., Burger, A.G., Meier, C.A. and Wahli, W. (1996). PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 804, 231-251.
- Lerchl, A. and Schlatt, S. (1993). Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 57, 359-364.
- LERNER, A.B. (1959). Mechanism of hormone action. *Nature* 184, 674-677.
- Letz, B., Schomerus, C., Maronde, E., Korf, H.W. and Korbmayer, C. (1997). Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type Ca²⁺ channels in rat pinealocytes. *J Physiol* 499 (Pt 2), 329-340.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.-L., Couturier, C., Delagrange, P. and Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 25, 3012-3023.
- Lewy, A.J., Ahmed, S., Jackson, J.M. and Sack, R.L. (1992). Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int* 9, 380-392.
- LIAO, S., DULANEY, J.T. and WILLIAMS-ASHMAN, H.G. (1962). Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide. *J Biol Chem* 237, 2981-2987.
- Limor, R., Ayalon, D., Capponi, A.M., Childs, G.V. and Naor, Z. (1987). Cytosolic free calcium levels in cultured pituitary cells separated by centrifugal elutriation: effect of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 120, 497-503.
- Lincoln, G.A. (1994). Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. *J Endocrinol* 142, 267-276.
- Lincoln, G.A. and Clarke, I.J. (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, G.A. and Clarke, I.J. (1995). Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a dopamine-independent mechanism to mediate effects of daylength on the secretion of prolactin in the ram. *J Neuroendocrinol* 7, 637-643.
- Lincoln, G.A., Clarke, I.J. and Sweeney, T. (1996). 'Hamster-like' cycles in testicular size in the absence of gonadotrophin secretion in HPD rams exposed to long-term changes in photoperiod and treatment with melatonin. *J Neuroendocrinol* 8, 855-866.
- Lincoln, G.A. and Richardson, M. (1998). Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119, 283-294.
- Lincoln, G.A., Andersson, H. and 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.
- Lincoln, G.A., Johnston, J.D., Andersson, H., Wagner, G. and Hazlerigg, D.G. (2005). Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology* 146, 3782-3790.
- Lind, R.W., Swanson, L.W. and Ganten, D. (1985). Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 40, 2-24.
- Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K. and Ueki, S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 16, 527-531.

- Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K. and Reppert, S.M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91-102.
- Lockley, S.W., Skene, D.J., James, K., Thapan, K., Wright, J. and Arendt, J. (2000). Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *J Endocrinol* 164, R1-6.
- Lonze, B.E. and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C., Rubio, A. and Guerrero, J.M. (1992). Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neurosci Lett* 136, 150-152.
- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M. and Takahashi, J.S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288, 483-492.
- Lowrey, P.L. and Takahashi, J.S. (2000). Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. *Annu Rev Genet* 34, 533-562.
- Lu, J., Zhang, Y.H., Chou, T.C., Gaus, S.E., Elmquist, J.K., Shiromani, P. and Saper, C.B. (2001). Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci* 21, 4864-4874.
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Gaudel, C., Jehl-Pietri, C., Fredenrich, A. and Grimaldi, P.A. (2004). Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome. *Biochimie* 86, 833-837.
- Lushington, K., Galka, R., Sassi, L.N., Kennaway, D.J. and Dawson, D. (2002). Extraocular light exposure does not phase shift saliva melatonin rhythms in sleeping subjects. *J Biol Rhythms* 17, 377-386.
- M-**
- MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64, 345-373.
- Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Coge, F., Chomarat, P., Mallet, C., Guenin, S.-P., Guillaumet, G., Viaud-Massuard, M.-C., Yous, S., Delagrangé, P. and Boutin, J.A. (2005). Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 71, 74-88.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice, F., Gayrard, V. and Thiery, J.C. (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 48, 752-760.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice, F., Locatelli, A. and Thiery, J.C. (1994). Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J Reprod Fertil* 101, 625-632.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G. and Chemineau, P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139, 1508-1516.
- Malpoux, B., Migaud, M., Tricoire, H. and Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 16, 336-347.
- Marchant, E.G. and Mistlberger, R.E. (1995). Morphine phase-shifts circadian rhythms in mice: role of behavioural activation. *Neuroreport* 7, 209-212.
- Maronde, E., Wicht, H., Tasken, K., Genieser, H.G., Dehghani, F., Olcese, J. and Korf, H.W. (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.
- Mason, R., Biello, S.M. and Harrington, M.E. (1991). The effects of GABA and benzodiazepines on neurones in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of Syrian hamsters. *Brain Res* 552, 53-57.
- Marquez S, Crespo P, Carlini V, Garbarino-Pico E, Baler R, Caputto BL, Guido ME. (2004). The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically

in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1. *FASEB J* 18, 519-21.

Mason, R. and Brooks, A. (1988). The electrophysiological effects of melatonin and a putative melatonin antagonist (N-acetyltryptamine) on rat suprachiasmatic neurones in vitro. *Neurosci Lett* 95, 296-301.

Mason, R. and Rusak, B. (1990). Neurophysiological responses to melatonin in the SCN of short-day sensitive and refractory hamsters. *Brain Res* 533, 15-19.

Masson-Pevet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureaux, M., Lakhdar-Ghazal, N. and Pevet, P. (1994). An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* 278, 97-106.

Masson-Pevet, M., Bianchi, L. and Pevet, P. (1996). Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. *J Neurosci Res* 43, 632-637.

Matsui, T., Sashihara, S., Oh, Y. and Waxman, S.G. (1995). An orphan nuclear receptor, mROR alpha, and its spatial expression in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 33, 217-226.

Matysiak-Scholze, U. and Nehls, M. (1997). The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics* 43, 78-84.

Mauviard, F., Pevet, P. and Forlot, P. (1991). 5-Methoxypsoralen enhances plasma melatonin concentrations in the male rat: non-noradrenergic-mediated stimulation and lack of effect in pinealectomized animals. *J Pineal Res* 11, 35-41.

Maywood, E.S., Bittman, E.L., Ebling, F.J., Barrett, P., Morgan, P. and Hastings, M.H. (1995). Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster. *J Neuroendocrinol* 7, 215-223.

Maywood, E.S. and Hastings, M.H. (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, E.S., O'Brien, J.A. and Hastings, M.H. (2003). Expression of mCLOCK and other circadian

clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* 15, 329-334.

McArthur, A.J., Gillette, M.U. and Prosser, R.A. (1991). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res* 565, 158-161.

McArthur, A.J., Hunt, A.E. and Gillette, M.U. (1997). Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138, 627-634.

McArthur, A.J., Coogan, A.N., Ajpru, S., Sugden, D., Biello, S.M. and Piggins, H.D. (2000). Gastrin-releasing peptide phase-shifts suprachiasmatic nuclei neuronal rhythms in vitro. *J Neurosci* 20, 5496-5502.

McNamara, P., Seo, S.P., Rudic, R.D., Sehgal, A., Chakravarti, D. and FitzGerald, G.A. (2001). Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 105, 877-889.

McNulty, S., Ross, A.W., Barrett, P., Hastings, M.H. and Morgan, P.J. (1994). Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6, 523-532.

McNulty, S., Schurov, I.L., Morgan, P.J. and Hastings, M.H. (1995). The inhibitory action of melatonin in the ovine pars tuberalis is not dependent on changes in plasma membrane potential. *J Endocrinol* 145, 471-478.

Medvedev, A., Yan, Z.H., Hirose, T., Giguere, V. and Jetten, A.M. (1996). Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* 181, 199-206.

Medvedev, A., Chistokhina, A., Hirose, T. and Jetten, A.M. (1997). Genomic structure and chromosomal mapping of the nuclear orphan receptor ROR gamma (RORC) gene. *Genomics* 46, 93-102.

Meijer, J.H. and Rietveld, W.J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 69, 671-707.

Messenger, S., Ross, A.W., Barrett, P. and Morgan, P.J. (1999). Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9938-9943.

- Messenger, S., Hazlerigg, D.G., Mercer, J.G. and Morgan, P.J. (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.
- Messenger, S., Garabette, M.L., Hastings, M.H. and Hazlerigg, D.G. (2001). Tissue-specific abolition of Per1 expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12, 579-582.
- Mikkelsen, J.D., Larsen, P.J., O'Hare, M.M. and Wiegand, S.J. (1991). Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience* 40, 55-66.
- Mikkelsen, J.D. and Larsen, P.J. (1993). Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry* 100, 3-16.
- Miller, J.D., Morin, L.P., Schwartz, W.J. and Moore, R.Y. (1996). New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep* 19, 641-667.
- Minami, Y., Furuno, K., Akiyama, M., Moriya, T. and Shibata, S. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide produces a phase shift associated with induction of mPer expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 113, 37-45.
- Mintz, E.M., Gillespie, C.F., Marvel, C.L., Huhman, K.L. and Albers, H.E. (1997). Serotonergic regulation of circadian rhythms in Syrian hamsters. *Neuroscience* 79, 563-569.
- Mintz, E.M., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Price, K.M. and Albers, H.E. (1999). Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci* 19, 5124-5130.
- Mitsuhashi, T., Tennyson, G.E. and Nikodem, V.M. (1988). Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5804-5808.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y. and Okamura, H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 15, 995-1006.
- Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S., Matsubara, K., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1989). Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57, 31-39.
- Miyake, S., Sumi, Y., Yan, L., Takekida, S., Fukuyama, T., Ishida, Y., Yamaguchi, S., Yagita, K. and Okamura, H. (2000). Phase-dependent responses of Per1 and Per2 genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 294, 41-44.
- Miyamoto, Y. and Sancar, A. (1998). Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6097-6102.
- Miyazaki, K., Nagase, T., Mesaki, M., Narukawa, J., Ohara, O. and Ishida, N. (2004). Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts. *Biochem J* 380, 95-103.
- Molinari, E.J., North, P.C. and Dubocovich, M.L. (1996). 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur J Pharmacol* 301, 159-168.
- Moore, R.Y. and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42, 201-206.
- Moore, R.Y. and Klein, D.C. (1974). Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 71, 17-33.
- Moore, R.Y. and Speh, J.C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150, 112-116.
- Moore, R.Y. (1995). Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp* 183, 88-99; discussion 100-6.
- Moore, R.Y. (1996). Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 73, 125-130.
- Morgan, P.J. (2000). The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion?. *J Neuroendocrinol* 12, 287-295.
- Morgan, P.J., Davidson, G.R. and Lawson, W. (1989). Evidence for dual adrenergic receptor regulation of ovine pineal function. *J Pineal Res* 7, 175-183.

Morgan, P.J., Harding, S.E. and Petrak, K. (1990). Interactions of a model block copolymer drug delivery system with two serum proteins and myoglobin. *Biochem Soc Trans* 18, 1021-1022.

Morgan, P.J., Hastings, M.H., Thompson, M., Barrett, P., Lawson, W. and Davidson, G. (1991). Intracellular signalling in the ovine pars tuberalis: an investigation using aluminium fluoride and melatonin. *J Mol Endocrinol* 7, 137-144.

Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E. and Helliwell, R. (1994). Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24, 101-146.

Morgan, P.J., Webster, C.A., Mercer, J.G., Ross, A.W., Hazlerigg, D.G., MacLean, A. and Barrett, P. (1996). The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 137, 4018-4026.

Morse, D. and Sassone-Corsi, P. (2002). Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci* 25, 632-637.

-N-

Naji, L., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M. and Calvo, J.R. (2004). Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74, 2227-2236.

Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y. and Honma, K.-i. (2004). Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORalpha in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett* 565, 122-126.

Nakaya, M., Sanada, K. and Fukada, Y. (2003). Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 494-501.

Nicolas-Frances, V., Dasari, V.K., Abruzzi, E., Osumi, T. and Latruffe, N. (2000). The peroxisome proliferator response element (PPRE) present at positions -681/-669 in the rat liver 3-ketoacyl-CoA thiolase B gene functionally interacts differently with PPARalpha and HNF-4. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 347-351.

Nielsen, H.S., Hannibal, J., Knudsen, S.M. and Fahrenkrug, J. (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces period1 and period2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus during late night. *Neuroscience* 103, 433-441.

Nishiwaki, T., Okamura, H., Kanemasa, K., Inatomi, T., Ibata, Y., Fukuhara, C. and Inouye, S.T. (1995). Differences of somatostatin mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus under light-dark and constant dark conditions: an analysis by in situ hybridization. *Neurosci Lett* 197, 231-234.

Nomura, K., Takeuchi, Y., Yamaguchi, S., Okamura, H. and Fukunaga, K. (2003). Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. *J Neurosci Res* 72, 384-392.

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

Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E. and Boutin, J.A. (2001). Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 61, 1369-1379.

-O-

Obrietan, K., Impey, S. and Storm, D.R. (1998). Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci* 1, 693-700.

Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T. and Ishida, N. (1998). Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 199-203.

Oishi, K., Fukui, H. and Ishida, N. (2000). Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 164-171.

Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G.-i., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M. and Kudo, T. (2003). Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem* 278, 41519-41527.

Oishi, K., Shirai, H. and Ishida, N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* 386, 575-581.

Okamoto, S., Okamura, H., Miyake, M., Takahashi, Y., Takagi, S., Akagi, Y., Fukui, K., Okamoto, H.

and Ibata, Y. (1991). A diurnal variation of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the rat suprachiasmatic nucleus. *Histochemistry* 95, 525-528.

Okamura, H. and 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, J.H. and van der Horst, G T (1999). Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286, 2531-2534.

Onishi, H., Yamaguchi, S., Yagita, K., Ishida, Y., Dong, X., Kimura, H., Jing, Z., Ohara, H. and Okamura, H. (2002). Rev-erb α gene expression in the mouse brain with special emphasis on its circadian profiles in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 68, 551-557.

Ortiz, M.A., Piedrafita, F.J., Pfahl, M. and Maki, R. (1995). TOR: a new orphan receptor expressed in the thymus that can modulate retinoid and thyroid hormone signals. *Mol Endocrinol* 9, 1679-1691.

Oster, H., Werner, C., Magnone, M.C., Mayser, H., Feil, R., Seeliger, M.W., Hofmann, F. and Albrecht, U. (2003). cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr Biol* 13, 725-733.

-P-

Panda, K., Rosenfeld, R.J., Ghosh, S., Meade, A.L., Getzoff, E.D. and Stuehr, D.J. (2002). Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* 277, 31020-31030.

Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N. and Hogenesch, J.B. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525-527.

Park, H.T., Baek, S.Y., Kim, B.S., Kim, J.B. and Kim, J.J. (1996). Developmental expression of 'RZR beta, a putative nuclear-melatonin receptor' mRNA in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 217, 17-20.

Park, H.T., Kim, Y.J., Yoon, S., Kim, J.B. and Kim, J.J. (1997). Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor beta (RZR beta), a

putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. *Brain Res* 747, 332-337.

Partch, C.L., Shields, K.F., Thompson, C.L., Selby, C.P. and Sancar, A. (2006). Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10467-10472.

Passilly-Degrace, P., Jannin, B., Boscoboinik, D., Motojima, K. and Latruffe, N. (2000). Ciprofibrate stimulates protein kinase C-dependent phosphorylation of an 85 kDa protein in rat Fao hepatic derived cells. *Biochimie* 82, 749-753.

Patel, D.D., Knight, B.L., Wiggins, D., Humphreys, S.M. and Gibbons, G.F. (2001). Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR α -deficient mice. *J Lipid Res* 42, 328-337.

Paul, P., Lahaye, C., Delagrangue, P., Nicolas, J.P., Canet, E. and Boutin, J.A. (1999). Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 334-340.

Pelletier, J., Bodin, L., Hanocq, E., Malpoux, B., Teyssier, J., Thimonier, J. and Chemineau, P. (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel(1a) receptor in the ewe. *Biol Reprod* 62, 1096-1101.

Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Garidou, M.-L., Wortel, J., van der Vliet, J., van Heijningen, C., Simonneaux, V., Pevet, P. and Buijs, R.M. (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. and Buijs, R.M. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci* 19, 318-324.

Peschke, E., Fauteck, J.D., Musshoff, U., Schmidt, F., Beckmann, A. and Peschke, D. (2000). Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28, 156-164.

Peters, J.M., Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J.C., Fievet, C., Gonzalez, F.J. and Auwerx, J. (1997). Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Biol Chem* 272, 27307-27312.

Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A.D. and Jockers, R. (1999). Differential signaling of

- human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58, 633-639.
- Pevet, P. (1988). The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev* 28, 443-458.
- Pevet, P. (1998). [Melatonin and biological rhythms]. *Therapie* 53, 411-420.
- Pevet, P., Bothorel, B., Sloten, H. and Saboureaux, M. (2002). The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* 309, 183-191.
- Pickard, G.E., Ralph, M.R. and Menaker, M. (1987). The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 2, 35-56.
- Pickard, G.E. (1994). Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. *Neuroreport* 5, 2186-2188.
- Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
- Piggins, H.D., Antle, M.C. and Rusak, B. (1995). Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker. *J Neurosci* 15, 5612-5622.
- Pitrosky, B., Kirsch, R., Malan, A., Mocaer, E. and Pevet, P. (1999). Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am J Physiol* 277, R812-28.
- Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1974). Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science* 186, 548-550.
- Pizzio, G.A., Hainich, E.C., Ferreyra, G.A., Coso, O.A. and Golombek, D.A. (2003). Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* 14, 1417-1419.
- Poirel, V.-J., Masson-Pevet, M., Pevet, P. and Gauer, F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 946, 64-71.
- Poirel, V.-J., Cailotto, C., Streicher, D., Pevet, P., Masson-Pevet, M. and Gauer, F. (2003a). MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol Lett* 24, 33-38.
- Poirel, V.J., Boggio, V., Dardente, H., Pevet, P., Masson-Pevet, M. and Gauer, F. (2003b). 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. and Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251-260.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P. and Rollag, M.D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 340-345.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F. and Rollag, M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 20, 600-605.
- Provencio, I., Rollag, M.D. and Castrucci, A.M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415.493.

-R-

- Rajaratnam, S.M. and Arendt, J. (2001). Health in a 24-h society. *Lancet* 358, 999-1005.
- Ralph, M.R. and Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241, 1225-1227.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975-978.
- Ramakrishnan, S.N. and Muscat, G.E.O. (2006). The orphan Rev-erb nuclear receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation?. *Nucl Recept Signal* 4.
- Raspe, E., Duez, H., Mansen, A., Fontaine, C., Fievet, C., Fruchart, J.-C., Vennstrom, B. and Staels, B. (2002a). Identification of Rev-erb α as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* 43, 2172-2179.
- Raspe, E., Mautino, G., Duval, C., Fontaine, C., Duez, H., Barbier, O., Monte, D., Fruchart, J., Fruchart, J.-C. and Staels, B. (2002b). Transcriptional regulation of human Rev-erb α gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor α . *J Biol Chem* 277, 49275-49281.

- Redman, J., Armstrong, S. and Ng, K.T. (1983). Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219, 1089-1091.
- Redman, J.R. and Armstrong, S.M. (1988). Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin. *J Pineal Res* 5, 203-215.
- Reebs, S.G. and 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.
- Reed, H.E., Meyer-Spasche, A., Cutler, D.J., Coen, C.W. and Piggins, H.D. (2001). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) phase-shifts the rat suprachiasmatic nucleus clock in vitro. *Eur J Neurosci* 13, 839-843.
- Reiter, R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1, 109-131.
- Reiter, R.J. and Tan, D.-X. (2002). Role of CSF in the transport of melatonin. *J Pineal Res* 33.61.
- Renaud, J.P., Harris, J.M., Downes, M., Burke, L.J. and Muscat, G.E. (2000). Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol Endocrinol* 14, 700-717.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Rivkees, S.A. and Stopa, E.G. (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242, 78-81.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. and Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-1185.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaughter, S.A. and Gusella, J.F. (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, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF Jr. (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 386, 219-24.
- Reppert, S.M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 12, 528-531.
- Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63, 647-676.
- Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941.
- Ribelayga, C., Pevet, P. and Simonneaux, V. (1997). Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res* 777, 247-250.
- Ribelayga, C., Garidou, M.L., Malan, A., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P. and Simonneaux, V. (1999). Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms* 14, 105-115.
- Ripperger, J.A. and Schibler, U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat Genet* 38, 369-374.
- Roca, A.L., Godson, C., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1996). Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology* 137, 3469-3477.
- Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A.D., Freissmuth, M., Jockers, R. and Nanoff, C. (1999). Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* 56, 1014-1024.
- Rollag, M.D. and Niswender, G.D. (1976). Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. *Endocrinology* 98, 482-489.
- Romijn, H.J., Sluiter, A.A., Pool, C.W., Wortel, J. and Buijs, R.M. (1997). Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 9, 2613-2623.
- Romijn, H.J., Sluiter, A.A., Wortel, J., Van Uum, J.F. and Buijs, R.M. (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.

- Roseboom, P.H. and Klein, D.C. (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, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C. and O'Hara, B.F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211-2213.
- Rudic, R.D., McNamara, P., Curtis, A.-M., Boston, R.C., Panda, S., Hogenesch, J.B. and Fitzgerald, G.A. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2.
- Rudolf, T., Filler, T. and Wittkowski, W. (1993). Pars tuberalis specific cells within the pars distalis of the adenohypophysis. An ontogenetic study. *Ann Anat* 175, 171-176.
- Rusak, B. and Zucker, I. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 59, 449-526.
- S-**
- Sack, R.L., Brandes, R.W., Kendall, A.R. and Lewy, A.J. (2000). Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med* 343, 1070-1077.
- Sakai, T., Sakamoto, S., Ijima, K., Matsubara, K., Kato, Y. and Inoue, K. (1999). Characterization of TSH-positive cells in foetal rat pars tuberalis that fail to express Pit-1 factor and thyroid hormone beta2 receptors. *J Neuroendocrinol* 11, 187-193.
- Sakanaka, M., Magari, S., Inoue, N. and Lederis, K. (1990). Co-localization of arginine vasopressin- and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 260, 549-554.
- Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O. and Leppaluoto, J. (2005). The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* 76, 1123-1134.
- Sanada, K., Okano, T. and 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.
- Sangoram, A.M., Saez, L., Antoch, M.P., Gekakis, N., Staknis, D., Whiteley, A., Fruechte, E.M., Vitaterna, M.H., Shimomura, K., King, D.P., Young, M.W., Weitz, C.J. and Takahashi, J.S. (1998). Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* 21, 1101-1113.
- Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Honda, K.K., Honma, S., Honma, K.-i. and Kato, Y. (2004a). Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem* 271, 4409-4419.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., Fitzgerald, G.A., Kay, S.A. and Hogenesch, J.B. (2004b). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527-537.
- Savaskan, E., Wirz-Justice, A., Olivieri, G., Pache, M., Krauchi, K., Brydon, L., Jockers, R., Muller-Spahn, F. and Meyer, P. (2002). Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem* 50, 519-526.
- Schaad, N.C., Vanecek, J., Rodriguez, I.R., Klein, D.C., Holtzclaw, L. and Russell, J.T. (1995). Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 47, 923-933.
- Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Kapfhammer, J.P. and Becker-Andre, M. (1997). The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur J Neurosci* 9, 2687-2701.
- Schomerus, C., Laedtke, E. and Korf, H.W. (1995). Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem Int* 27, 163-175.
- Schuhler, S., Pitrosky, B., Saboureaux, M., Lakhdar-Ghazal, N. and Pevet, P. (1999). Role of the thalamic intergeniculate leaflet and its 5-HT afferences in the chronobiological properties of 8-OH-DPAT and triazolam in syrian hamster. *Brain Res* 849, 16-24.
- Schwartz, W.J. and Reppert, S.M. (1985). Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 5, 2771-2778.
- Shalev, A., Siegrist-Kaiser, C.A., Yen, P.M., Wahli, W., Burger, A.G., Chin, W.W. and Meier, C.A.

- (1996). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137, 4499-4502.
- Sharma, V.K., Chandrashekar, M.K., Singaravel, M. and Subbaraj, R. (1999). In the field mouse *Mus booduga* melatonin phase response curves (PRCs) have a different time course and wave form relative to light PRC. *J Pineal Res* 26, 153-157.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F.J. and Reppert, S.M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261-1269.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T., Hastings, M.H. and Reppert, S.M. (2000a). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.
- Shearman, L.P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2000b). Targeted disruption of the *mPer3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 20, 6269-6275.
- Shen, S., Spratt, C., Sheward, W.J., Kallo, I., West, K., Morrison, C.F., Coen, C.W., Marston, H.M. and Harmar, A.J. (2000). Overexpression of the human VPAC2 receptor in the suprachiasmatic nucleus alters the circadian phenotype of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11575-11580.
- Shibata, S., Cassone, V.M. and Moore, R.Y. (1989). Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 97, 140-144.
- Shibata, S., Ono, M., Tominaga, K., Hamada, T., Watanabe, A. and Watanabe, S. (1994). Involvement of vasoactive intestinal polypeptide in NMDA-induced phase delay of firing activity rhythm in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Biobehav Rev* 18, 591-595.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C. and Okamura, H. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 91, 1043-1053.
- Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T. and Tezuka, M. (2005). Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12071-12076.
- Shin, H.D., Park, B.L., Kim, L.H., Jung, H.S., Cho, Y.M., Moon, M.K., Park, Y.J., Lee, H.K. and Park, K.S. (2004). Genetic polymorphisms in peroxisome proliferator-activated receptor delta associated with obesity. *Diabetes* 53, 847-851.
- Shinohara, K., Tominaga, K., Isobe, Y. and Inouye, S.T. (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.
- SIDMAN, R.L., LANE, P.W. and DICKIE, M.M. (1962). Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 137, 610-612.
- Silver, R., Romero, M.T., Besmer, H.R., Leak, R., Nunez, J.M. and LeSauter, J. (1996a). Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced Fos. *Neuroreport* 7, 1224-1228.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A. and Lehman, M.N. (1996b). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810-813.
- Simonneaux, V., Ouichou, A., Craft, C. and Pevet, P. (1994). Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J Neurochem* 62, 2464-2471.
- Simonneaux, V., Kozak, R., Arsenijevic, Y. and Pevet, P. (1996). Vasopressin potentiation of the melatonin synthetic pathway via specific V1a receptors in the rat pineal gland. *Regul Pept* 61, 63-69.
- Simonneaux, V. and Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55, 325-395.
- Sims, K.B., Hoffman, D.L., Said, S.I. and Zimmerman, E.A. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* 186, 165-183.
- Skinner, D.C. and Malpoux, B. (1999). High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140, 4399-4405.

- Slaugenhaupt, S.A., Roca, A.L., Liebert, C.B., Altherr, M.R., Gusella, J.F. and Reppert, S.M. (1995). Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics* 27, 355-357.
- Slotten, H., Pitrosky, B. and Pevet, P. (1999a). Entrainment of rat circadian rhythms by daily administration of melatonin. Influence of the mode of administration. *Adv Exp Med Biol* 460, 279-281.
- Slotten, H.A., Pitrosky, B. and Pevet, P. (1999b). Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 14, 347-353.
- Smirnov, A.N. (2001). Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 66, 19-26.
- Sohda, T., Mizuno, K., Imamiya, E., Tawada, H., Meguro, K., Kawamatsu, Y. and Yamamoto, Y. (1982). Studies on antidiabetic agents. III. 5-Arylthiazolidine-2,4-diones as potent aldose reductase inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 30, 3601-3616.
- Sollars, P.J., Kimble, D.P. and Pickard, G.E. (1995). Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. *J Neurosci* 15, 2109-2122.
- Song, C.K., Bartness, T.J., Petersen, S.L. and Bittman, E.L. (2000). Co-expression of melatonin (MEL1a) receptor and arginine vasopressin mRNAs in the Siberian hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol* 12, 627-634.
- Starkey, S.J. (1996). Melatonin and 5-hydroxytryptamine phase-advance the rat circadian clock by activation of nitric oxide synthesis. *Neurosci Lett* 211, 199-202.
- Starkey, S.J., Walker, M.P., Beresford, I.J. and Hagan, R.M. (1995). Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin in vitro. *Neuroreport* 6, 1947-1951.
- Stehle, J., Vanecek, J. and 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, J.H., Rivkees, S.A., Lee, J.J., Weaver, D.R., Deeds, J.D. and Reppert, S.M. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 6, 384-393.
- Stehle, J.H., Foulkes, N.S., Pevet, P. and Sassone-Corsi, P. (1995). Developmental maturation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. *Mol Endocrinol* 9, 706-716.
- Stehle, J.H., von Gall, C. and Korf, H.W. (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.
- Stehle, J.H., von Gall, C. and Korf, H.-W. (2002). Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res* 309, 173-182.
- Stehlin-Gaon, C., Willmann, D., Zeyer, D., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Renaud, J.-P., Moras, D. and Schule, R. (2003). All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta. *Nat Struct Biol* 10, 820-825.
- Steineger, H.H., Sorensen, H.N., Tugwood, J.D., Skrede, S., Spydevold, O. and Gautvik, K.M. (1994). Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur J Biochem* 225, 967-974.
- Steinmayr, M., Andre, E., Conquet, F., Rondi-Reig, L., Delhaye-Bouchaud, N., Auclair, N., Daniel, H., Crepel, F., Mariani, J., Sotelo, C. and Becker-Andre, M. (1998). staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3960-3965.
- Stephan, F.K. and 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.
- Stirland, J.A., Johnston, J.D., Cagampang, F.R., Morgan, P.J., Castro, M.G., White, M.R., Davis, J.R. and Loudon, A.S. (2001). Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J Neuroendocrinol* 13, 147-157.
- Stoeckel, M.E., Hindelang, C., Klein, M.J., Poissonnier, M. and Felix, J.M. (1994). Expression of the alpha-subunit of glycoprotein hormones in the pars tuberalis-specific glandular cells in rat, mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Res* 278, 617-624.

- Stoeckel, M.E., Hindelang-Gertner, C. and Porte, A. (1979). Embryonic development and secretory differentiation in the pars tuberalis of the mouse hypophysis. *Cell Tissue Res* 198, 465-476.
- Stojilkovic, S.S., Chang, J.P., Ngo, D., Tasaka, K., Izumi, S. and Catt, K.J. (1989). Mechanism of action of GnRH: the participation of calcium mobilization and activation of protein kinase C in gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem* 33, 693-703.
- Sturgill, T.W., Ray, L.B., Erikson, E. and Maller, J.L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334, 715-718.
- Sugden, L.A., Sugden, D. and Klein, D.C. (1987). Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem* 262, 741-745.
- Sumi, Y., Yagita, K., Yamaguchi, S., Ishida, Y., Kuroda, Y. and Okamura, H. (2002). Rhythmic expression of ROR beta mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 320, 13-16.
- Sumova, A. and Illnerova, H. (1996). Melatonin instantaneously resets intrinsic circadian rhythmicity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 218, 181-184.
- Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90, 1003-1011.
- Sun, X., Liu, T., Deng, J. and Borjigin, J. (2003). Long-term in vivo pineal microdialysis. *J Pineal Res* 35, 118-124.
- Sutherland, C. and Cohen, P. (1994). The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS Lett* 338, 37-42.
- Swaab, D.F., Nijveldt, F. and Pool, C.W. (1975). Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 67, 461-462.
- T-**
- Takahashi, J.S., Pinto, L.H. and Vitaterna, M.H. (1994). Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* 264, 1724-1733.
- Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N. and Okamura, H. (1998a). A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 3, 167-176.
- Takumi, T., Taguchi, K., Miyake, S., Sakakida, Y., Takashima, N., Matsubara, C., Maebayashi, Y., Okumura, K., Takekida, S., Yamamoto, S., Yagita, K., Yan, L., Young, M.W. and Okamura, H. (1998b). A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. *EMBO J* 17, 4753-4759.
- Tamarkin, L., Baird, C.J. and Almeida, O.F. (1985). Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science* 227, 714-720.
- Tanaka, M., Okamura, H., Matsuda, T., Shigeyoshi, Y., Hisa, Y., Chihara, K. and Ibata, Y. (1996). Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: a double labeling in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 215, 119-122.
- Tanaka, M., Hayashi, S., Tamada, Y., Ikeda, T., Hisa, Y., Takamatsu, T. and Ibata, Y. (1997). Direct retinal projections to GRP neurons in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 8, 2187-2191.
- Teclemariam-Mesbah, R., Ter Horst, G.J., Postema, F., Wortel, J. and Buijs, R.M. (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. and Sakaki, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512-516.
- Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R. and Evans, R.M. (1987). Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science* 237, 1610-1614.
- Thomson, P.A., Wray, N.R., Thomson, A.M., Dunbar, D.R., Grassie, M.A., Condie, A., Walker, M.T., Smith, D.J., Pulford, D.J., Muir, W., Blackwood, D.H.R. and Porteous, D.J. (2005). Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry* 10, 470-478.
- Ting, K.N., Blaylock, N.A., Sugden, D., Delagrange, P., Scalbert, E. and Wilson, V.G. (1999). Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol* 127, 987-995.

Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Lin, F.J., Myers, E.M., Barnes, J.W., Meyer-Bernstein, E.L., Hurst, W.J., Burgoon, P.W., Chen, D., Sehgal, A. and Gillette, M.U. (1999). Oscillation and light induction of timeless mRNA in the mammalian circadian clock. *J Neurosci* 19.

Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Tyan, S.-H., Buchanan, G.F. and Gillette, M.U. (2003). Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* 278, 718-723.

Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Pace, L.A., Barnes, J.W., Barnes, J.A. and Gillette, M.U. (2004). Protein kinase G type II is required for night-to-day progression of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 539-549.

Tominaga, K., Shinohara, K., Otori, Y., Fukuhara, C. and Inouye, S.T. (1992). Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3, 809-812.

Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5, 571-576.

Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M. and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7728-7733.

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

Triqueneaux, G., Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M.P., Safi, R., Takahashi, J.S., Delaunay, F. and Laudet, V. (2004). The orphan receptor Rev-erbalpha gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol* 33, 585-608.

Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., Eckel, R.H., Takahashi, J.S. and Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043-1045.

-U-

Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K.-i., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y. and Hashimoto, S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418, 534-539.

-V-

Vacas, M.I., Sarmiento, M.I. and Cardinali, D.P. (1981). Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus in vitro. *Brain Res* 225, 207-211.

Vakkuri, O., Leppaluoto, J. and Vuolteenaho, O. (1984). Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. *Acta Endocrinol (Copenh)* 106, 152-157.

Vamecq, J. and Draye, J.P. (1989). Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays Biochem* 24, 115-225.

van de Veerdonk, F C and Konijn, T.M. (1970). The role of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate and catecholamines in the pigment migration process in *Xenopus laevis*. *Acta Endocrinol (Copenh)* 64, 364-376.

Van den Pol, A N (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191, 661-702.

van den Pol, A N and Tsujimoto, K.L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15, 1049-1086.

van den Top, M., Buijs, R.M., Ruijter, J.M., Delagrange, P., Spanswick, D. and Hermes, M.L. (2001). Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience* 107, 99-108.

van der Horst, G T, Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. and Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630.

van Esseveldt, K.E., Lehman, M.N. and Boer, G.J. (2000). The suprachiasmatic nucleus and the

- circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 34-77.
- Vandesande, F., Dierickx, K. and De Mey, J. (1975). Identification of separate vasopressin-neurophysin II and oxytocin-neurophysin I containing nerve fibres in the external region of the bovine median eminence. *Cell Tissue Res* 158, 509-516.
- Vanecek, J., Pavlik, A. and Illnerova, H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435, 359-362.
- Vanecek, J. (1988). Melatonin binding sites. *J Neurochem* 51, 1436-1440.
- Vanecek, J. and Vollrath, L. (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res* 505, 157-159.
- Vanecek, J. and Klein, D.C. (1992). Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca²⁺ in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 130, 701-707.
- Vanecek, J. and Klein, D.C. (1993). A subpopulation of neonatal gonadotropin-releasing hormone-sensitive pituitary cells is responsive to melatonin. *Endocrinology* 133, 360-367.
- Vanecek, J. and Kosar, E. (1994). Ontogenesis of melatonin receptors in anterior pituitary and pars tuberalis of golden hamsters. *Physiol Res* 43, 379-382.
- Vanecek, J. (1995). Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways. *Mol Cell Endocrinol* 107, 149-153.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H. and Virshup, D.M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol* 20, 4888-4899.
- Villey, I., de Chasseval, R. and de Villartay, J.P. (1999). RORgammaT, a thymus-specific isoform of the orphan nuclear receptor RORgamma / TOR, is up-regulated by signaling through the pre-T cell receptor and binds to the TEA promoter. *Eur J Immunol* 29, 4072-4080.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-725.
- von Gall, C., Stehle, J.H. and Weaver, D.R. (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309, 151-162.
- von Gall, C., Noton, E., Lee, C. and Weaver, D.R. (2003). Light does not degrade the constitutively expressed BMAL1 protein in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 18, 125-133.
- von Gall, C., Weaver, D.R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J.H. and Korf, H.-W. (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.
- Vu-Dac, N., Gervois, P., Grotzinger, T., De Vos, P., Schoonjans, K., Fruchart, J.C., Auwerx, J., Mariani, J., Tedgui, A. and Staels, B. (1997). Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *J Biol Chem* 272, 22401-22404.
- Vu-Dac, N., Chopin-Delannoy, S., Gervois, P., Bonnelye, E., Martin, G., Fruchart, J.C., Laudet, V. and Staels, B. (1998). The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 273, 25713-25720.
- W-**
- Wahli, W., Braissant, O. and Desvergne, B. (1995). Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more... *Chem Biol* 2, 261-266.
- Wakamatsu, H., Takahashi, S., Moriya, T., Inouye, S.T., Okamura, H., Akiyama, M. and Shibata, S. (2001). Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* 12, 127-131.
- Watanabe, K., Yamaoka, S. and Vanecek, J. (1998). Melatonin inhibits spontaneous and VIP-induced vasopressin release from suprachiasmatic neurons. *Brain Res* 801, 216-219.
- Watson, S.J., Akil, H., Fischli, W., Goldstein, A., Zimmerman, E., Nilaver, G. and van wimersma Griedanus, T B (1982). Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurons. *Science* 216, 85-87.
- Weaver, D.R., Namboodiri, M.A. and Reppert, S.M. (1988). Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *FEBS Lett* 228, 123-127.

- Weaver, D.R., Rivkees, S.A. and Reppert, S.M. (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J Neurosci* 9, 2581-2590.
- Weaver, D.R., Liu, C. and Reppert, S.M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10, 1478-1487.
- Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1996). The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8, 109-112.
- Welsh, D.K. and Reppert, S.M. (1996). Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 706, 30-36.
- Welsh, D.K., Yoo, S.-H., Liu, A.C., Takahashi, J.S. and Kay, S.A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* 14, 2289-2295.
- White, B.H., Sekura, R.D. and Rollag, M.D. (1987). Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J Comp Physiol [B]* 157, 153-159.
- Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J.P., Schrader, M. and Carlberg, C. (1995). Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* 23, 327-333.
- Williams, L.M., Hannah, L.T., Hastings, M.H. and Maywood, E.S. (1995). Melatonin receptors in the rat brain and pituitary. *J Pineal Res* 19, 173-177.
- Witt-Enderby, P.A., Masana, M.I. and Dubocovich, M.L. (1998). Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139, 3064-3071.
- Wittkowski, W., Bergmann, M., Hoffmann, K. and Pera, F. (1988). Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 251, 183-187.
- Wittkowski, W., Bockmann, J., Kreutz, M.R. and Bockers, T.M. (1999). Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* 185, 157-194.
- Wolf, G. (2003). The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta in energy homeostasis. *Nutr Rev* 61, 387-390.
- Wong, S.K. and Garbers, D.L. (1992). Receptor guanylyl cyclases. *J Clin Invest* 90, 299-305.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9, 2431-2438.
- Wright, K.P.J. and Czeisler, C.A. (2002). Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees. *Science* 297, 571.
- Wurtman, R.J. and Anton-Tay, F. (1969). The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog Horm Res* 25, 493-522.
- X, Y, Z -**
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G T and Okamura, H. (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 292, 278-281.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Miyake, S., Yan, L., Onishi, H., Yagita, K., Suzuki, M., Shibata, S., Kobayashi, M. and Okamura, H. (2000). The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr Biol* 10, 873-876.
- Yamase, K., Takahashi, S., Nomura, K., Haruta, K. and Kawashima, S. (1991). Circadian changes in arginine vasopressin level in the suprachiasmatic nuclei in the rat. *Neurosci Lett* 130, 255-258.
- Yamazaki, S., Goto, M. and Menaker, M. (1999). No evidence for extraocular photoreceptors in the circadian system of the Syrian hamster. *J Biol Rhythms* 14, 197-201.
- Yan, L., Takekida, S., Shigeyoshi, Y. and Okamura, H. (1999). Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* 94, 141-150.
- Yang, J., Tominaga, K., Otori, Y., Fukuhara, C., Tokumasa, A. and Inouye, S. (1994). Day-night variation of preprosomatostatin messenger RNA level in the suprachiasmatic nucleus. *Mol Cell Neurosci* 5, 97-102.

- Yang, S.H., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. and Sharrocks, A.D. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol Cell Biol* 18, 710-720.
- Yin, L. and Lazar, M.A. (2005). The orphan nuclear receptor Rev-erb α recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol Endocrinol* 19, 1452-1459.
- Yokota, S., Yamamoto, M., Moriya, T., Akiyama, M., Fukunaga, K., Miyamoto, E. and Shibata, S. (2001). Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *J Neurochem* 77, 618-627.
- Young, W.S.3., Kovacs, K. and Lolait, S.J. (1993). The diurnal rhythm in vasopressin V1a receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin. *Endocrinology* 133, 585-590.
- Yu, L., Schaad, N.C. and Klein, D.C. (1993). Calcium potentiates cyclic AMP stimulation of pineal arylalkylamine N-acetyltransferase. *J Neurochem* 60, 1436-1443.
- Zamir N, Palkovits M, Brownstein MJ. (1983). Distribution of immunoreactive dynorphin in the central nervous system of the rat. *Brain Res* 280, 81-93.
- Zamir, I., Harding, H.P., Atkins, G.B., Horlein, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. and Lazar, M.A. (1996). A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol Cell Biol* 16, 5458-5465.
- Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. and Lazar, M.A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14400-14405.
- Zhang, B., Berger, J., Zhou, G., Elbrecht, A., Biswas, S., White-Carrington, S., Szalkowski, D. and Moller, D.E. (1996). Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271, 31771-31774.
- Zhao, Q., Yang, X.L., Holtzclaw, W.D. and Talalay, P. (1997). Unexpected genetic and structural relationships of a long-forgotten flavoenzyme to NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1669-1674.
- Zheng, L., Stojilkovic, S.S., Hunyady, L., Krsmanovic, L.Z. and Catt, K.J. (1994). Sequential activation of phospholipase-C and -D in agonist-stimulated gonadotrophs. *Endocrinology* 134, 1446-1454.
- Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C. and Bradley, A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400, 169-173.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1998a). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20, 1103-1110.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Levine, J.D., Jin, X., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1998b). Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* 21, 1115-1122.

CURRICULUM VITAE



Laurence AGEZ

18 rue Léon Hornecker
67 200 Strasbourg, France
Téléphone : +33 (0)6.15.41.21.30
agezlaurence@yahoo.fr

Née le 16 Octobre 1977
Nationalité française

Compétences

Neurosciences

Les rythmes circadiens

Biologie moléculaire

Hybridation *in situ* radioactive

Clonage de séquences

Microchirurgie

Stérotaxie sur rongeurs

Tests comportementaux

Test de Porsolt

Essai clinique

Analyse de résultats

Recherche bibliographique

Statistiques et Informatique

Sigmaplot

Microsoft office

Gestion de projet

Organisation,

Animation d'équipe

Définition d'un budget

Expérience Professionnelle

Depuis Octobre 2003: **Allocataire de recherche**

Département de Neurobiologie des Rythmes de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives. Strasbourg

Sujet de thèse : « *Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de la mélatonine sur les noyaux suprachiasmatiques, rôle de trois récepteurs orphelins.* »

Participation à l'encadrement d'étudiants BTS et master

Participation aux demandes de financements (définition du budget)

Participation à l'organisation du congrès 2005 de la « société Francophone de Chronobiologie » (Strasbourg)

Juillet 2006 à Septembre 2006: **Stagiaire pour le Diplôme inter-universitaire d'investigateur des essais cliniques**

Unité de coordination de la biologie des essais cliniques de l'Hôpital Civil de Strasbourg
Service qualité

Sujet: « *Mise en place des recommandations pour le suivi pré et post analytiques des échantillons de la biologie des essais cliniques* ».

Septembre 2002 à Juin 2003: **Stagiaire de DEA**

Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes à l'ULP, Strasbourg I,

Sujet: « *Les effets de la pinéalectomie sur les rythmes d'expression de $\text{ror}\beta$ et rev-erba dans les noyaux suprachiasmatiques et la pars tuberalis chez le rat* ».

Juillet 2002: **Stagiaire de maîtrise** de physiologie
Laboratoires de Plasticité Neuromusculaire et de Neurosciences du Comportement à
l'Université des sciences et technologie de Lille
Sujet : « *les effets de la microgravité sur le niveau de stress chez les rongeurs par des tests comportementaux* »

Juillet 2001: Stagiaire
Laboratoire Récepteurs nucléaires, lipoprotéines et athérosclérose à l'Institut Pasteur de Lille
Sujet : *modifications du cholestérol par différentes réactions chimiques*

Juillet 1998 et Juillet 1999 : Emplois saisonniers dans la vente par correspondance
Assistante de direction, télé-prospectrice

Formation

Université Louis Pasteur, Strasbourg
2007: **Doctorat de Neurosciences**
2006: **Diplôme inter-universitaire d'investigateur des essais cliniques**
2003: DEA de Neurosciences

Formation complémentaire :
2004: Initiation au Marketing
2003: Initiation à l'entrepreneuriat

Langue

Anglais: utilisation courante

Références

Pr. François Gauer (Ph.D)
Tel : +33 (0)3 88 45 66 88
Fax : +33 (0)3 88 45 66 54
gauer@neurochem.u-strasbg.fr

Dr. Gydé-Laurent (Ph.D)
Tel : +33 (0)3 88 45 66 75
Fax : +33 (0)3 88 45 66 54
gydelaurent@neurochem.u-strasbg.fr

Publications et Communications

Cf. annexe

Annexe

Publications

P. Pévet, L. Agez, B. Bothorel, M. Saboureau, F. Gauer, V. Laurent and M. Masson-Pévet. (2006) Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world, *Chronobiol Int.* ; 23(1-2):39-51.

L. Agez, V. Laurent, P. Pévet, M. Masson-Pévet and F. Gauer. (2007)
Phase-dependent responses of nuclear orphan receptor mRNA expression to a melatonin injection in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* ; 144:522–530.

L. Agez, V. Laurent, D. Bohn, A. Senser, P. Pévet, M. Masson-Pévet and F. Gauer. (2007)
Pinealectomy induces lost of *ror β* et *rev-erba* transcription rhythms in the *pars tuberalis* but not in the rat suprachiasmatic nuclei. *En cours de soumission (journal of pineal research)*

Communications

8 - 12 juillet 2006 (Vienne) : The Federation of European Neuroscience Societies (FENS),
« Unique melatonin induces a rapid phase-shift of *rev-erba* mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. » Poster
Laurence Agez, Virginie Laurent, Paul Pévet, Mireille Masson-Pévet and François Gauer.

1 - 5 septembre 2005 (Francfort) : Europeans Pineal and Biological Rhythms Society congress,
« Phase-dependent responses of nuclear orphan receptor mRNA expression to a melatonin injection in the rat suprachiasmatic nuclei. » Poster
Laurence Agez, Virginie Laurent, Paul Pévet, Mireille Masson-Pévet and François Gauer.

21 avril 2005 (Strasbourg) : Brainstorming, société francophone de chronobiologie,
« Effets d'une injection pharmacologique de la mélatonine sur le rythme d'expression des ARNm des récepteurs orphelins *rev-erba*, *rora* et *ror β* dans les NSC et la PT du rat. » communication orale
Laurence Agez.

18 - 20 avril 2005 (Strasbourg) : Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie,
« Effet différencié de la pinéalectomie sur l'expression des facteurs de transcription *ror β* et *rev-erba* dans la *pars tuberalis* et les noyaux suprachiasmatiques du rat. » Poster
Agez Laurence, Laurent Virginie, Masson-Pévet Mireille et Gauer François.

4 avril 2005 (Strasbourg) : Congrès Neurex,
« Phase-dependent responses of nuclear orphan receptor mRNA expression to a melatonin injection in the rat suprachiasmatic nuclei. » Poster
Agez Laurence, Laurent Virginie, Pévet Paul, Masson-Pévet Mireille and Gauer François

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]

Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei

L. AGEZ, V. LAURENT, P. PÉVET, M. MASSON-PÉVET ET F. GAUER

Neuroscience, 2007, Vol. 144, Pages 522–530

Pages 522 à 530 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.030>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr