

THESE
Présentée à

L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR de STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
Neurosciences
par

Céline A. FEILLET

Synchronisation par la nourriture
des horloges circadiennes
centrales et périphériques

Soutenance le 8 Octobre 2007
devant la commission :

Pr. Franck DELAUNAY
Dr. Francis LEVI
Pr. Rémy SCHLICHTER
Pr. Urs ALBRECHT
Dr. Paul PEVET
Dr. Etienne CHALLET

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Tous les champignons sont comestibles...
Certains, une fois seulement.

Remerciements

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au **Dr. Mireille Masson-Pévet**, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes, à l'époque en zoologie. Merci de m'avoir permis d'y effectuer mon DEA puis ma thèse. C'est un peu grâce à vous que je suis entrée dans la famille des rythmes biologiques et je vous en remercie. Merci aussi pour votre soutien et votre franchise. Il est toujours bon de savoir à quoi s'en tenir.

Merci également au **Dr. Paul Pévet** dont la culture « physiologiste » et le franc parler m'ont permis de développer un mode de réflexion rapide et pertinente. Devoir défendre et justifier mes propos scientifiques (et parfois moins scientifiques) au quotidien a grandement contribué à ma formation doctorale. Merci aussi pour votre soutien lors de la collaboration avec la Suisse, qui n'aurait probablement pas eu lieu sans vous. J'espère vous retrouver encore dans les congrès... autour d'une bonne bière bien sûr.

Je remercie vivement les membres de ce jury qui ont eu l'obligeance de s'intéresser à ce travail et pris la peine de le juger. Le **Pr. Rémi Schlichter** qui par ses enseignements est à la base de nombre de mes connaissances en neurosciences. Le **Dr. Francis Levy** qui est lui-même familier avec la question de la restriction alimentaire. Le **Dr. Franck Delaunay**, enseignant dans l'université dans laquelle j'ai moi-même étudié et avec qui j'ai eu la chance d'échanger quelques idées lors de congrès.

Je tiens à remercier tout particulièrement le **Pr. Urs Albrecht**, qui a accepté d'être examinateur pour ce travail. Il a contribué à l'encadrement de ma thèse durant les quelques mois que j'ai passés dans son laboratoire... et c'est avec grand plaisir que nous continuerons notre collaboration dans quelques mois. Urs, je souhaite vivement qu'elle soit aussi fructueuse que par le passé et que nos rapports personnels soient toujours ce qu'ils ont été. Merci à toi pour ton soutien et ta tolérance.

Merci également à **Sylviane Gourmelen** pour son aide dans chacune des expériences que j'ai conduites durant ma thèse. Sylviane, tu as des qualités indéniables pour ce qui est des animaux. Tu as toujours été disponible pour moi, y compris pour des expériences difficiles à gérer, aussi bien du point de vue des chirurgies que du point de vue de la maintenance hebdomadaire. Pour avoir pris le temps d'échanger avec moi des ragots et des points de vue sur des sujets divers et variés, je te remercie. J'espère vivement te revoir dans les prochaines années.

Je fais un clin d'œil au **Dr. Dominique Ciocca** qui m'a initiée aux canulations carotidiennes et a accepté de m'accompagner au quotidien dans une expérience qui n'était pas gagnée d'avance, et qui s'est même révélée plutôt maudite. Je ne sais pas si nos origines « du sud » ont contribué à notre entente, mais je sais que nous avons formé une super équipe. Merci Dom !

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

N'oubliant pas que chacune des personnes du laboratoire a été à mon écoute, a supporté mes colères, m'a aidée ou épaulée à un moment ou à un autre de ma thèse, je remercie l'ensemble

des membres du laboratoire de neurobiologie des rythmes, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Aucun remerciement ne serait complet sans un paragraphe sur mon super-viseur bien aimé (et non pas chef... je sais que tu n'aimes pas que je t'appelle comme ça). Donc un grand merci au **Dr. Etienne Challet** qui a encadré ce travail. Etienne, tu as accepté de m'encadrer pour mon DEA... et tu en as assumé les conséquences sans (trop) râler, malgré mon caractère difficile et les reproches d'autres personnes. Sans te décourager, tu es ensuite devenu mon directeur de thèse pour ce qui aura été un marathon de 4 ans : ta culture scientifique sans bornes, ton esprit critique et la mine d'or de biblio que tu gardes jalousement dans ton bureau sont pour beaucoup dans le bon déroulement de ma thèse. Arriver avec une question dans ton bureau, c'est repartir avec 3 articles à lire... tu ne donnes pas seulement les informations pertinentes, tu obliges à les analyser. Il est difficile de ne pas acquérir un minimum d'esprit scientifique à ton contact. Pour ce qui est de la pédagogie, c'est une autre affaire ! Nous avons longuement discuté de mon intérêt pour l'enseignement... et nous étions rarement d'accord sur ce point. J'étais pour toi trop souvent accaparée par les étudiants, les formations... Mais tu as toujours respecté mon choix et je t'en remercie. Ce n'est d'ailleurs pas la seule chose que tu as respectée : mes week-ends à Nice, Paris ou Londres, mes envies de voyages, mes idées saugrenues en sciences, mon penchant pour les couleurs vives, mes tenues et coiffures fantaisistes, mes éclats de voix et de caractère... en y repensant, il t'a fallu gérer une scientifique en herbe, une enseignante acharnée, une femme colérique, une petite fille capricieuse... tout ça en même temps. Au final, nous nous sommes accordés là-dessus, notre tandem était un pari risqué, mais nous ne nous en sommes pas trop mal sortis... comme quoi, des caractères opposés mais complémentaires peuvent être compatibles.

S'il est évident que je ne peux que te remercier pour ton encadrement efficace quand j'étais à Strasbourg, ton soutien a été encore plus important pour moi lorsque je n'y étais pas. En entrant en thèse je t'ai dit que je voulais voyager. Qu'à cela ne tienne, six mois plus tard, je partais à Fribourg pour commencer une collaboration très fructueuse avec Urs. Un an plus tard, tu m'apprenais que le projet avec le Mexique se concrétisait et que j'y partirais quelques mois si je le souhaitais... ce que je faisais l'année suivante. Et enfin tu m'as autorisée à présenter un projet de collaboration avec le Japon, ce qui, tu en avais plus conscience que moi, allait resserrer le timing pour rendre ma thèse. En bref, tu m'as toujours soutenue dans mes choix, épaulée au téléphone ou par mail quand, à l'autre bout du monde, j'avais des doutes sur l'intérêt de ce que je faisais ou que je rencontrais quelques problèmes relationnels... cela dit, je te soupçonne de m'avoir envoyée à l'étranger à époques régulières afin de pouvoir souffler un peu face à mon caractère... En tous cas, toutes ces collaborations ont été de merveilleuses expériences pour moi. Merci de m'avoir permis de vivre ça.

Etienne, je me rends compte, au terme de ces quatre années, combien tu as été présent tout en me laissant autonome, directif en me laissant la liberté de discuter des protocoles, ferme sans pour autant être autoritaire, indulgent mais pas laxiste, tu as respecté mes idées sans pour autant me laisser aller dans le mur, tu m'as encouragée à enseigner alors que tu n'aimais pas ça toi même... si tu étais moins lunatique tu pourrais être le « chef » parfait... compte sur moi pour te faire un lettre de recommandation pour les prochains étudiants qui viendront. Je sais qu'ils ne seront pas déçus du voyage.

Sur un plan plus personnel, nous avons eu l'occasion de partager de multiples discussions : famille, amis, angoisses, coups de gueule, fou rires, déménagement, travaux, bières... tu as été plus qu'un super-viseur... j'ai le sentiment d'avoir partagé une tranche de vie avec toi. Sache que si nous devons collaborer de nouveau à l'avenir, j'en serais ravie, parce que tu as des qualités indéniables... et que je connais et j'ai appris à faire avec tes défauts. Merci Etienne.

Si le soutien des personnes avec lesquelles j'ai collaboré durant ma thèse a été important pour ma réussite, ma famille et mes proches l'ont été bien davantage.

Ma première pensée va à **mes parents**, qui m'ont épaulée, tant moralement que financièrement au cours de ces 28 années.

Papa, tu m'as enseigné ce que le « savoir être » signifiait... depuis mon plus jeune âge, tu as encouragé mon esprit de compétition, d'abord dans le sport puis dans les études, peut-être parfois trop, et ma personnalité actuelle est probablement l'émanation de tes 28 années d'éducation. Tu m'as encouragée depuis le début dans le choix difficile que j'avais fait de quitter Nice et les miens. Tu avais confiance en ma réussite... d'autant plus que la ville qui allait m'accueillir, tu y avais étudié toi-même 30 ans auparavant. Tu m'as assurée de ton soutien, souvent dans l'ombre, mais nos discussions téléphoniques dans les moments les plus difficiles ne m'ont laissé aucun doute quant au fait que tu suivais mon parcours, souvent par l'intermédiaire de maman, plus prompte à saisir le combiné téléphonique lorsque le moindre nuage se profilait à l'horizon. Nos conversations philosophiques lors de mes retours à Nice, les stages de ski et notre voyage au Mexique m'accompagnent toujours comme autant de bons moments passés... Merci Papa.

Mum, I hear you complaining seeing that my father came first in my « thanks », But you are to be blamed as much as him for my current situation : you were ready to listen to me every single day, for moral as well as for physical problems, you have always been like a security blanket a baby carries around everywhere. Even if you sometimes pay for the spitefulness of others, you welcome (most of the time) my bad moods with kindness and reassuring words... but you were also here to listen to every day's ordinary events, and this availability is even more important for me than that of hard times. If my interest in Biology does not originate from your education, you are probably responsible for my knowledge in English, partly because you taught me that language very early, and partly because you incited me to practice, sometimes with you, during our multiple shopping week ends in London. I am happy to be finally able to thank you for that... and also for the rest... everything. Thank you.

A tous les deux un grand merci d'avoir été toujours là... cette thèse est aussi un peu la votre !

Merci à toute ma famille, de sang ou non : **Mamy, Ma, Néné, Nicole, Roger** et tous les autres qui m'ont soutenue et ont cru en mes capacités à réussir. Je vous embrasse tous.

Merci à **Nary et Alain** pour m'avoir acceptée dans leur cercle familial. Vous êtes un peu à l'origine de mon choix de faire une thèse, puisque vous-mêmes aviez vécu cette expérience et m'avez encouragée à faire de même. Merci pour les discussions sur des sujets divers et variés, du cinéma aux aléas de la recherche et pour votre soutien inconditionnel.

Merci à **Gérard et Marie-Jeanne**, mes « parents » Alsaciens, d'abord pour m'avoir accueillie sans conditions et intégrée à leur cercle de connaissances afin que la solitude ne me pèse pas trop. Merci pour votre disponibilité et votre amitié. Par contre, je ne remercie pas Marie-Jeanne de m'avoir fait prendre ma première cuite... et d'autres après ça... même si nous avons bien ri à ce sujet depuis ! Je souhaite vivement qu'après mon départ, nous puissions continuer à manger (et boire) ensemble comme nous l'avons fait ces dernières années, même si les rencontres seront probablement plus espacées. A tous les deux (et à vos deux monstres) merci.

Un moral au beau fixe étant essentiel à la réussite humaine d'une thèse, je souhaite associer à ce travail tous mes amis, qui ont grandement contribué à cette thèse par leur écoute et leur disponibilité.

Merci donc à **Titi** (mon choupinet belge), **Narc** (le plus coquin d'entre nous), **Nico et Anne** (maintenant indissociables), **Dams** (le tombeur au grand cœur... toujours pas marié), **Géry et Fanny** (les plus raisonnables... enfin, depuis l'enterrement de « la boîte »), **Adrien** (discret, mais toujours là dans les grands moments), **Olivier** (Eolh, mon bien aimé, l'autre thésard de la bande), **Camille et Yohann** (qui ont toujours fait l'effort de venir à nos soirées malgré des emplois du temps difficiles), **Sylvie et Anthony** (expatriés à Paris, mais toujours dans nos pensées), et même à **Laurent et Sma** (parce que leurs facéties alimentent nos conversations)... donc à tous les niçois un grand merci pour les soirées, les vacances (à la montagne et au ski), les coups de téléphone, les fêtes... merci pour la bonne humeur que vous m'avez apportée au quotidien, pour les bouffées d'air en votre compagnie... 10 ans déjà... je souhaite que ça ne s'arrête jamais !

D'autres ont contribué à mon équilibre mental (ou à conserver mon déséquilibre)... je pense bien sûr aux Anastasiens, qui pour la plupart sont devenus plus que des partenaires de jeux de rôles. Merci donc à **Kogh, Maika et Vince**, les belges du groupe qui m'ont accueillie à bras ouverts dans leur équipe et leur maison... Merci à **Seb et Méli** que je connais de mieux en mieux depuis mon séjour en Suisse et que j'espère revoir plus souvent dès l'année prochaine... Merci à **Ellias et Titine** pour tous les bons moments... Je n'oublie pas **Fengus**, mon frère d'armure, humour décalé et délires à gogo sont sa devise... enfin, **Axel, Taline, Blackrider, Adon, Zadar, Nadram, Wark**... vous me manquez tous... à très bientôt j'espère.

Un grand clin d'œil à **Audrey et Laétitia**, mes amies de longue date, ainsi qu'à leurs maris.

Si la disponibilité de mes amis d'ailleurs a été déterminante, la présence de ceux de Strasbourg m'a permis de partager mes doutes au quotidien. J'ai une douce pensée pour **R2D2**, à la fois ma voisine, ma secrétaire et ma partenaire du jeudi soir, pour **Ben** (sans commentaires, ce serait trop long), **Steeve** (trop beau pour être vrai), **Laurent** (toujours une bonne blague), **Anne** (franche et vraie), **Zeina** (pour toutes nos conversations), **Virginie** (statutaire co-optée), ainsi qu'à **Sandrine, Jorge, Corina, Domitille, Elodie, Emma, Anthony, Emeline, VJ**... et bien d'autres qui m'ont aidée dans les moments les plus durs et avec qui nous avons partagé de nombreuses soirées. Merci à tous.

J'ai une pensée pour ceux qui m'ont accueillie dans leur cercle d'amis lors de mes voyages : Mary-Carmen, Roberto, Katia, Manuel, Yareli, Oscar (au Mexique), Nath, Sandra, Hélène, Camille, Giuseppe, Cippola, Mathieu, Guillaume, Manu, Steeve, Corine, Isa, Gabi, Guru, Sonia... (à Fribourg).

Je souhaite que les nouveaux arrivants au labo profitent autant que moi de leur thèse. Un coucou à Marc, Laurent, Matei, Lyne, Marilyne, Maya, Julien, Laura, Nadia... Bonne chance à vous tous.

Enfin, parce qu'il est des personnes qui comptent au-delà du travail, des amis et de la famille puisqu'elles partagent tout cela à la fois, j'embrasse tendrement **mon petit Mikha**.

Mikha, durant toutes ces années que nous avons passées ensemble tu m'as soutenue et m'as apporté ton amour au quotidien. Nous avons fait le pari risqué de mettre 200, puis 1000 km entre nous alors que notre relation était encore fraîche. Nous aurions pu ne jamais nous retrouver, mais avons su évoluer en parallèle durant ces années. Puis tu as pris la décision de venir vivre avec moi à Strasbourg, loin des tiens, après plusieurs années passées à distance. Notre pari est réussi je crois !

Ta gentillesse t'a permis de supporter depuis des années mon caractère dominateur et tu as appris à me dompter tout en me laissant croire que je décide de tout. Tu m'offres un oreille attentive chaque soir quand je te raconte les fou rires et les coups de gueule du jour au labo... je crois que tu pourrais soutenir ma thèse à ma place tant tu as entendu parler d'horloge alimentaire ces 5 dernières années. Si tes attentions sont quotidiennes depuis longtemps, tu as été encore plus prévenant et disponible ces derniers mois, et tu as épongé mes coups de gueule et coups de blues sans râler afin de rendre ma fin de thèse plus facile. Tu m'as suivie dans nombre de mes délires, a réparé nombre de mes erreurs, accepté mes défauts... Je t'aime. Maintenant, nous pouvons enfin souffler et partir pour le voyage de notre vie... je vais tâcher de te bichonner autant que tu l'as fait pour moi...

REMERCIEMENTS	2
Abréviations.....	12
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	15
I. Généralités.	17
1. Historique : découverte des horloges.	17
2. Intérêts écologiques des horloges.....	17
3. Qu'est ce qu'une horloge ?.....	18
3.1. Définitions.....	18
3.2. Horloge ou oscillateur ?	18
4. Horloges circadiennes.	19
II. Une horloge principale : <i>Les noyaux suprachiasmatiques</i> de l'hypothalamus.	19
1. Historique.	19
1.1. Approche lésionnelle.....	19
1.2. Localisation.	20
2. Réception du message circadien.	21
2.1. Les voies d'entrée.....	22
2.1.1. Rétine.	22
2.1.2. Feuilletts inter-géniculés thalamiques (IGL).....	22
2.1.3. Raphé.....	22
2.1.4. Des récepteurs.	23
2.1.4.1. Récepteurs à la mélatonine.....	23
2.1.4.2. Récepteurs métaboliques.....	23
3. Intégration du message circadien.	24
3.1. Les rythmes en absence de synchroniseur.....	24
3.2. Comment savoir si un message a été intégré ?.....	24
3.3. Intégration du message photique.....	25
3.3.1. Synchronisation par la lumière.....	25
3.3.2. Créneau de lumière.....	26
3.3.3. Décalage horaire.....	26
3.4. Synchronisation non photique.....	27
3.4.1. Mélatonine.....	27
3.4.2. Pharmacologie.....	28
3.4.3. Comportement.....	28
3.4.4. Nourriture.	29
3.5. Limites de l'entraînement.....	31
4. Elaboration du message circadien.	32
4.1. Origine moléculaire : les gènes horloges.	32
4.1.1. Boucle positive.....	32
4.1.2. Boucle négative.	32
4.1.2.1. Les gènes Per et Cry.....	32
4.1.2.2. Mutants simples.....	33
4.1.2.3. Doubles mutants.....	34
4.1.2.4. Triples mutants.....	34

4.1.3. Boucles intermédiaires.....	34
4.1.3.1. Rev-erb.....	34
4.1.3.2. Ror.....	35
4.1.4. D'autres partenaires possibles ?.....	35
4.1.4.1. Tim.....	35
4.1.4.2. DEC.....	35
4.1.5. Régulations pré et post traductionnelles.....	36
4.2. Modèle moléculaire.....	36
5. Distribution du message circadien.....	37
5.1. Puissance des SCN.....	37
5.2. Sorties moléculaires (CCG = Clock Controlled Genes).....	38
5.2.1. AVP.....	38
5.2.2. DBP.....	38
5.3. Neurotransmetteurs, neuropeptides, peptides.....	38
5.3.1. Neurotransmetteurs.....	38
5.3.2. Neuropeptides.....	39
5.3.2.1. VIP.....	39
5.3.2.2. Autres.....	39
5.3.3. Peptides.....	39
5.3.3.1. TGF.....	39
5.3.3.2. PK2.....	39
5.3.3.3. CLC.....	40
5.3.4. Régionalisation des SCN.....	40
5.4. Relation gènes horloges / comportement.....	41
5.4.1. Réponse photique.....	41
5.4.1.1. Créneau de lumière.....	41
5.4.2. Réponse non photique.....	41
5.4.2.1. Mélatonine.....	41
5.4.2.2. Hyperactivité transitoire.....	42
5.4.2.3. Nourriture.....	42
5.5. Activité électrique.....	43
5.6. Projections nerveuses.....	43
5.7. Sorties physiologiques.....	44
5.7.1. Mélatonine.....	44
5.7.2. Corticostérone.....	45
5.7.3. Glucose et autres métabolites plasmatiques.....	46
5.7.4. Température.....	47
5.8. Sorties comportementales.....	47
III. D'autres horloges circadiennes ?.....	48
1. Horloges cellulaires.....	49
1.1. Elaboration du message : expression des gènes horloges dans toutes les cellules....	49
1.2. Réception / intégration.....	50
1.3. Distribution du message.....	50
2. Horloges tissulaires périphériques ?.....	51
2.1. Foie, rein, poumon.....	51
2.2. Glandes surrénales.....	52
2.3. Rétine.....	53
2.3.1. Réception et distribution d'un message.....	53
2.3.2. Elaboration d'un message rythmique.....	53

3. Horloges tissulaires centrales.....	54
3.1. Horloges ou oscillateurs esclaves des SCN ?.....	54
3.2. Les bulbes olfactifs.....	54
IV. Une autre horloge putative : l'horloge alimentaire.	55
1. Historique.....	55
2. Mise en évidence.....	55
2.1. Rat et souris.....	55
3. Distribution d'un message circadien : sorties.....	56
3.1. Activité locomotrice (FAA).....	57
3.1.1. Expérience de jeûne.....	57
3.2. Boisson.....	58
3.3. Autres sorties comportementales.....	58
3.4. Température (FAT).....	59
3.5. Corticostérone (FAC).....	59
3.6. Leptine et ghréline.....	60
3.7. Paramètres métaboliques.....	61
4. Réception d'un synchroniseur ?.....	62
4.1. Non photique.....	62
4.1.1. Disponibilité alimentaire.....	62
4.1.2. Anticipation d'un apport en sel.....	63
4.1.3. Anticipation d'un seul nutriment.....	63
4.1.4. Repas appétitifs.....	64
4.1.5. Eau.....	64
4.1.6. Pharmacologie.....	65
4.2. Photique.....	65
5. A la frontière entre réception et distribution : Connectique de l'horloge alimentaire.	66
5.1. Systèmes de neurotransmetteurs et neuropeptides.....	66
5.1.1. Le système glutamatergique.....	66
5.1.2. Le système dopaminergique.....	66
5.1.3. Le système noradrénergique.....	67
5.1.4. Le système histaminergique.....	68
5.1.5. Le système opioïdique.....	68
5.1.6. Le système orexinergique.....	69
6. Intégration des synchroniseurs.....	71
6.1. Décalage horaire de l'accès à la nourriture.....	71
6.2. Limites de l'entraînement.....	72
7. Fonctionnement de l'horloge alimentaire : élaboration du message rythmique ?.....	73
7.1. Des gènes horloges ?.....	73
7.2. Les KO pour les gènes horloges.....	74
7.2.1. <i>Clock</i>	74
7.2.2. <i>Npas</i>	75
7.2.2.1. KO <i>Npas</i>	76
7.2.2.2. <i>Npas2</i> , un remplaçant possible pour <i>Clock</i>	76
7.2.3. <i>Cry</i>	77
8. Une nouvelle horloge centrale : l'horloge alimentaire.....	78
9. Localisation de l'horloge alimentaire.....	79
9.1. Système nerveux central vs périphérique.....	79
9.1.1. Le foie, le pancréas.....	79
9.1.2. Le système digestif dans son ensemble.....	80

9.2. Approche lésionnelle.....	81
9.2.1. Bulbes olfactifs.....	81
9.2.2. Structures hypothalamiques et thalamiques.....	81
9.2.2.1. Hypothalamus ventromédial (VMH).....	81
9.2.2.2. L'aire hypothalamique latérale (LH).....	82
9.2.2.3. Noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN).....	82
9.2.2.4. Noyau arqué (Arc).....	83
9.2.2.5. Noyaux hypothalamiques dorsomédiaux (DMH).....	84
9.2.2.6. Noyau paraventriculaire thalamique (PVT).....	85
9.2.3. Système limbique.....	85
9.3. Tronc cérébral.....	87
9.3.1. Influence sur une seule sortie.....	88
9.3.1.1. Hypophyse.....	88
9.3.1.2. Cortex infralimbique.....	88
9.4. Autres structures.....	89
9.5. Un réseau de plusieurs structures.....	89
CHAPITRE 2 OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE.....	91
CHAPITRE 3 RESULTATS.....	95
I. Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output.....	97
II. Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food anticipatory activity.....	108
III. Restricted feeding in SCN-lesioned rats restores daily rhythms not only of locomotor activity but also of pineal melatonin: role of corticosterone?.....	117
IV. Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice.....	138
V. Forebrain oscillators ticking with different clock hands.....	153
CHAPITRE 4 DISCUSSION GENERALE.....	187
I. Intégration du synchroniseur alimentaire.....	189
1. Interprétation par les SCN du synchroniseur alimentaire.....	189
2. Intégration du message de synchronisation alimentaire hors SCN.....	191
II. Mécanismes moléculaires de la synchronisation alimentaire.....	194
1. Les souris mutantes : outil privilégié pour l'étude de la synchronisation alimentaire... 194	
1.1. Les mutants <i>Npas2</i> et <i>Clock</i>	195
1.2. Les mutants <i>Cry</i>	197
1.3. Nécessité de standardiser l'étude des mutants.....	198
1.4. Mutants <i>Per</i>	200
III. De l'importance des sorties de l'horloge alimentaire.....	202

1. La mélatonine.....	202
2. La corticostérone.....	206
IV. Substrat anatomique de l'horloge alimentaire.....	206
1. La glande surrénale.....	207
2. Une approche innovante pour découvrir la localisation de l'horloge alimentaire.....	207
3. PER2, une protéine clé pour la recherche de l'horloge alimentaire.....	209
4. Un modèle de réseau pour la synchronisation alimentaire.....	210
V. Nécessité d'une horloge chef d'orchestre : Synchronisation alimentaire versus Horloge alimentaire.....	212
CHAPITRE 5 PERSPECTIVES.....	215
I. Implication de Per1 dans la synchronisation alimentaire....	217
II. A la recherche du substrat anatomique de l'horloge alimentaire.....	217
1. Horloge centrale ou périphérique ?.....	217
2. Restauration de fonction dans le système nerveux central.....	218
III. Utilisation de souris exprimant un gène rapporteur.....	218
CHAPITRE 6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	221
CHAPITRE 7 ANNEXES.....	237

Abréviations

2-DG : 2-désoxyglucose	DMH : noyaux hypothalamiques dorsomédiaux
3V : troisième ventricule	dmSCN : SCN dorsomédial
AA-NAT : Aryl-Alkylamine N-Acetyl Transférase	dST : striatum dorsal
ACTH : <i>Adreno corticotropic hormone</i> = Hormone corticotrope	EGF : <i>Epidermal growth factor</i>
ANOVA : Analyse de la variance	FAA : <i>Food anticipatory activity</i> = activité anticipatoire de la prise alimentaire
a.u. : Unité arbitraire	FAC : <i>Food anticipatory corticosterone</i> = pic anticipatoire de corticostérone
Arc : noyau arqué	FAT : <i>Food anticipatory thermogenesis</i> = thermogenèse anticipant la prise alimentaire
ARNm : ARN messenger	FEC : <i>Food entrainable clock</i> : horloge alimentaire
AVP : Arginine vasopressine	FEO : <i>food entrainable oscillator</i> : oscillateur alimentaire
AP : area postrema	GABA : acide γ -amino-butérique
aPirC : cortex piriforme antérieur	GD : gyrus denté
bHLH : <i>basic helix loop helix</i>	GH : <i>growth hormone</i> = hormone de croissance
BLA : amygdale basolatérale	GHT : <i>geniculo-hypothalamic tract</i> = tractus géniculo-hypothalamique
Bmal1/BMAL1 : <i>Brain and muscle ARN-t like protein 1</i>	GLU : glutamate
BNST : noyau du lit de la strie terminale	GRE : <i>glucocorticoid responsive element</i>
CA : corne d'ammon	GRP : <i>Gastrin releasing peptide</i>
CCG : <i>clock-controlled gene</i> = gène contrôlé par l'horloge	h : heures
CEA : amygdale centrale	KO : knock out
CKI : Caséine kinase I	IGL : feuillets inter-géniculés
Clock/ Clk/CLOCK : <i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>	IML : colonne intermédiaire-latérale de la moelle épinière
CO : chiasma optique	LD : <i>Light-Dark</i> = Alterance du jour et de la nuit
CRH : <i>Corticotropin Releasing Hormone</i> = cortico-libérine	LH : Aire hypothalamique latérale
Cry/CRY : cryptochrome	LL : <i>light/light</i> = lumière constante
CT : <i>circadian time</i> = temps circadien	LUC : luciférase
DBP : <i>Albumin gene D-site binding protein</i>	μm : micromètres
DD : <i>Dark-Dark</i> = obscurité constante	MPN : noyau préoptique médian
DEC : <i>Differentially expressed chondrocytes protein</i>	
DIT : <i>Diet induced thermogenesis</i> = thermogenèse induite par la prise alimentaire	

Npas/NPAS : Neuronal PAS
NPB : noyau parabrachial
NPY : Neuropeptide Y
NRD : noyau du raphé dorsal
NRM : noyau du raphé médian
NTS : noyau du tractus solitaire
PAS : Period-Arnt-sim
Per/PER : Period
PK2 : Prokineticine 2
PVN : noyaux paraventriculaires hypothalamiques
PVT : noyau paraventriculaire thalamique
RC : restriction calorique
Rev-erb/REV-ERB : *reverse viral erythroblastis oncogene product*
RF : *restricted feeding* = restriction temporelle
RHT : *retino-hypothalamic tract* = Tractus rétinohypothalamique

RORE : *REV-ERB/ROR Response element*
Ror/ROR : *Retinoic acid-related orphan receptor*
SCN : Noyaux suprachiasmatiques
SNS : Système nerveux sympathique
SUMO : *Small ubiquitin-related modifier protein*
Tim : *timeless*
TGF : *Transforming growth factor*
TSH : Hormone stimulant la thyroïde
VIP : vasoactive intestinal peptide
vISCN : SCN ventrolatéral
VMH : Noyaux hypothalamiques ventromédiaux
WT : *wild type* = sauvage
ZT : *Zeitgeber Time*

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

I. Généralités.

1. Historique : découverte des horloges.

Depuis des millénaires, l'omniprésence des phénomènes rythmiques a conduit à de nombreuses observations et corrélations. Force nous est de constater que notre vie est rythmée par les battements de notre cœur, notre rythme de veille/sommeil ou l'alternance de périodes de vigilance accrue ou diminuée.

La première description écrite de rythmes journaliers date de 325 avant J.C. où Androsthènes Thasius exposait les mouvements journaliers des feuilles de *Tamarindus indicus*.

Mais c'est en 1729 que l'astronome français De Mairan publie des observations cruciales pour la chronobiologie : La Sensitive (*Mimosa pudica*) présente des mouvements d'ouverture (le matin) et de repli (le soir) de ses feuilles qui sont indépendants du cycle jour/nuit (LD) puisqu'ils persistent en obscurité constante (DD).

Une autre observation cruciale fut réalisée par le botaniste français De Candolle au 19^e siècle (1832) : il constata que la période des plantes placées en lumière constante (LL) différait légèrement de 24 heures.

Ces travaux pionniers ont ouvert la voie à toutes les recherches actuelles en chronobiologie. Ils ont en effet attiré l'attention sur le fait que nombre de phénomènes rythmiques ne suivent pas passivement l'alternance du jour et de la nuit, mais persistent en l'absence de repères temporels.

2. Intérêts écologiques des horloges.

Les organismes vivant à la surface de la Terre n'évoluent généralement pas en conditions constantes. Plantes et animaux sont exposés à des variations journalières et saisonnières de l'environnement et montrent des changements internes dynamiques en réponse à ces fluctuations externes. Ces variations sont la conséquence :

- de la rotation de la Terre autour de son axe qui occasionne une alternance du jour et de la nuit.
- de la rotation de la Terre autour du soleil qui crée des modifications saisonnières de la durée du jour et de la température sous nos latitudes, des saisons sèches et pluvieuses dans les régions plus tropicales.

Ces changements dynamiques de l'environnement sont rythmiques et donc prévisibles pourvu que l'organisme possède un système adapté d'estimation du temps. Ce système, ce sont les horloges. Elles permettent, en fournissant une estimation absolue du temps, d'anticiper les changements de l'environnement, et de préparer ainsi l'organisme à ces modifications en initiant des processus cellulaires et physiologiques avant que leur fonctionnement soit requis. Quand ils deviennent nécessaires, ils fonctionnent déjà de manière optimale ; il n'y a donc pas de délai entre la demande et l'offre.

Du point de vue évolutif, si l'on considère qu'une caractéristique présentant un avantage pour la survie de l'organisme a de fortes probabilités d'être transmise et reprise dans l'évolution, il est probable que les horloges aient un intérêt non négligeable : on les retrouve en effet dans la grande majorité des espèces étudiées jusqu'ici, des Cyanobactéries aux Mammifères en passant par les Champignons, les Plantes, les Insectes, les Poissons, les Reptiles et les Oiseaux.

Cependant, même s'il serait intéressant d'effectuer une étude extensive des horloges chez ces différents organismes, notre propos se limitera ici aux Mammifères et plus particulièrement au Rongeurs. Même si l'on garde à l'esprit que des mécanismes voisins ou divergents existent dans d'autres embranchements, ils ne seront pas exposés ici.

3. Qu'est ce qu'une horloge ?

Il est important, avant toute considération expérimentale, de définir ce que l'on entend par le terme d'horloge. La première caractéristique, qui est elle même à l'origine du terme d'horloge, est l'endogénicité du rythme : cela signifie que le rythme observé quel qu'il soit, doit persister en conditions constantes, c'est à dire en l'absence de tout repère temporel.

3.1. Définitions

Dans les études qui vont suivre, nous nous placerons dans un cadre plus contraignant encore : Pour pouvoir considérer un système comme étant une horloge, celui-ci devra répondre à 4 critères :

- Une horloge **génère** de manière endogène des oscillations auto entretenues : en l'absence de synchroniseurs, le fonctionnement de l'horloge putative est encore mesurable, selon une période stable et persistante nommée « période de libre cours ».
- Une horloge est capable de **percevoir** des informations relatives à un ou plusieurs stimuli.
- Une horloge peut **intégrer** ces informations. Le stimulus va alors influencer, synchroniser le système. Dans ce cas, le rythme endogène sera couplé au zeitgeber (de l'allemand « donneur de temps ») de sorte que leurs oscillations auront la même période. Cette synchronisation ne doit être possible que dans un domaine limité de fréquences d'entraînement, en général voisines de la fréquence endogène de l'horloge.
- Une horloge **distribue** un message rythmique à une ou plusieurs sorties. Ces sorties sont mesurables et ont la même période que l'entité qui les contrôle.

3.2. Horloge ou oscillateur ?

Les systèmes amenant des oscillations :

- Auto entretenues mais indépendantes de l'environnement (pacemakers).
- Dépendantes d'un autre système (esclaves).

- Caractérisées par une amplitude décroissante en absence de zeitgeber (amorties).

Ne répondent pas aux critères avancés pour des horloges. Ces systèmes seront considérés comme des oscillateurs jusqu'à ce que preuve soit faite de leur nature d'horloge.

4. Horloges circadiennes.

Tout comme les ondes électromagnétiques, les rythmes biologiques ont un très large spectre de fréquences, allant de 100 Hertz pour les décharges neuronales à 10^{-9} Hertz (30 ans) pour les très longs cycles des populations.

Les rythmes sont ainsi classés en 3 catégories, selon leur période :

- Période très inférieure à 24 heures : rythme ultradien. Exemples : décharges neuronales, battements cardiaques.
- Période voisine de 24 heures : rythme circadien (du latin *circa* : environ et *dies* : un jour). Exemples : activité locomotrice, température, sécrétion d'hormones.
- Période très supérieure à 24 heures : rythme infradien. Exemples : mues saisonnières, hibernation.

Ces rythmes peuvent être ou non sous contrôle d'une horloge. S'ils sont les sorties d'une horloge, cette horloge pourra être synchronisée par divers paramètres environnementaux, comme l'alternance du jour et de la nuit (rythmes circadiens), des saisons (rythmes saisonniers, circannuels) ou des lunes (circa-lunaires). S'ils ne sont pas contrôlés par une horloge, ils seront alors des réactions passives à des paramètres extérieurs. En l'absence du stimulus environnemental, ils disparaîtront. Notre cadre d'étude se limitera à des rythmes circadiens soumis au contrôle d'une horloge. Il ne sera plus fait référence aux autres types de rythmes.

II. Une horloge principale : *les noyaux suprachiasmatisques* de l'hypothalamus.

1. Historique.

1.1. Approche lésionnelle.

A l'instar d'un grand nombre de structures cérébrales, l'identification de l'horloge circadienne des Mammifères résulte d'une approche lésionnelle. En 1972, Stephan et Zucker ainsi que Moore et Eichler démontrent respectivement que la lésion **d'une seule structure hypothalamique paire** est suffisante pour induire une perte du rythme d'activité locomotrice et du rythme de sécrétion de corticostérone.

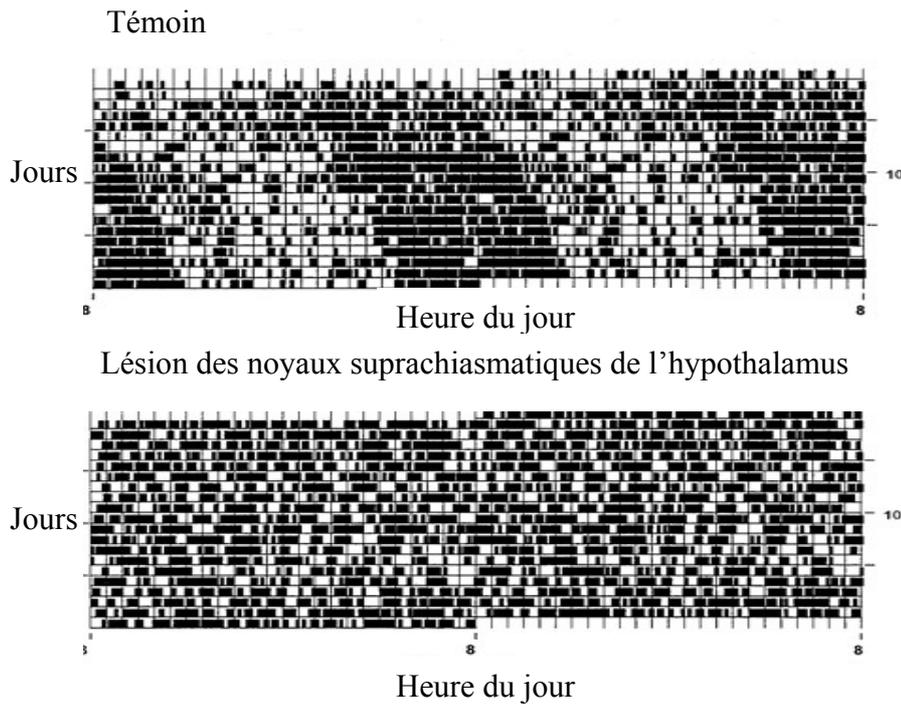


Figure 1 : Expérience de lésions : l'ablation d'une structure hypothalamique abolit les rythmes d'activité locomotrice.

Actogrammes d'un rat placé en obscurité constante. Les périodes d'activité sont représentées par des barres noires. Les actogrammes sont en double représentation, c'est à dire que le 2^e jour est représenté à la fois sur la première ligne et la seconde ligne. Après lésion, l'activité locomotrice ne présente plus de rythmicité circadienne.

(Adapté de Stephan et Zucker, 1972)

1.2. Localisation.

Cette structure paire composée d'environ 16000 neurones chez le rat se trouve dans l'hypothalamus, de part et d'autre du 3^e ventricule, juste au dessus du chiasma optique ce qui lui a valu son nom : **les noyaux suprachiasmatiques** (SCN). Ils sont organisés en un réseau très dense de petits neurones. Chez le rat, ils mesurent 400 μm de haut, 425 μm de large et 900 μm de longueur rostro-caudale (Van den Pol, 1980).

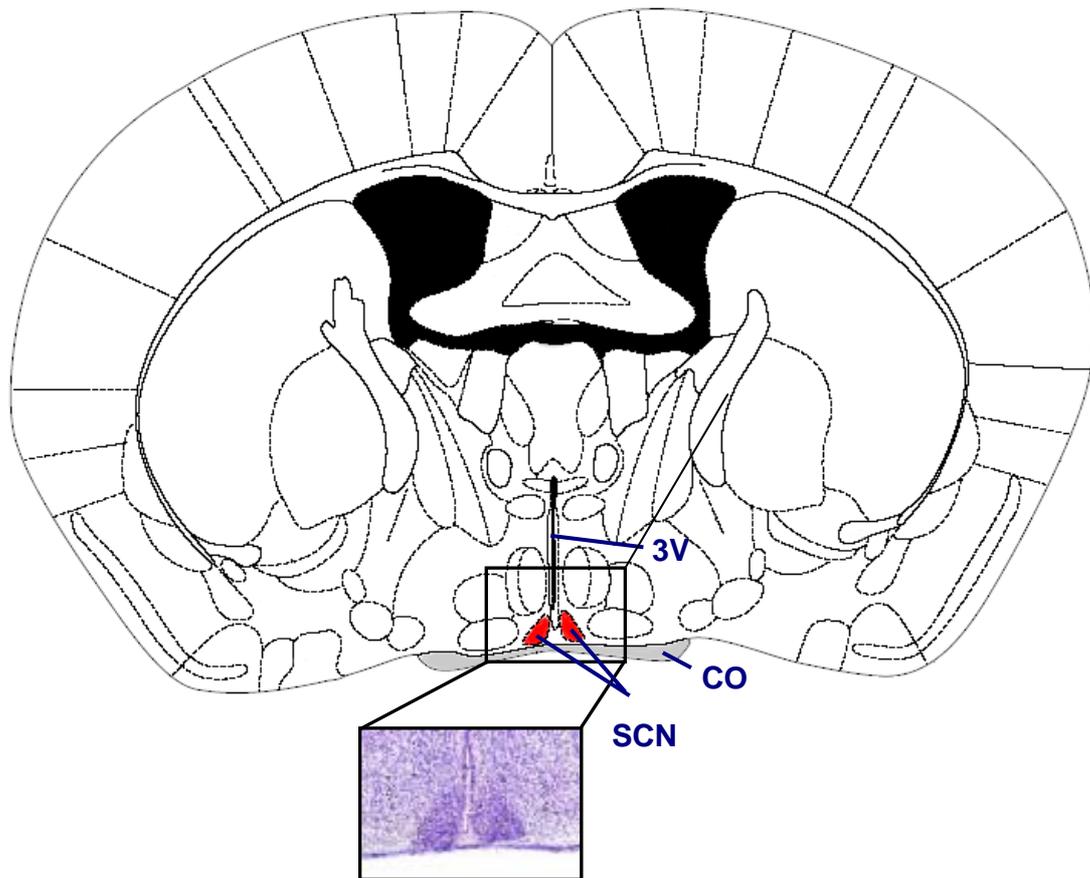


Figure 2 : Localisation des noyaux suprachiasmatiques chez la souris.

Coupe coronale d'un cerveau de souris représentant la position des SCN (en rouge) au dessus du chiasma optique (CO) en gris. L'encart représente une section agrandie des SCN après coloration au violet de crésyl. 3V = troisième ventricule.

(Adapté de Paxinos et Franklin, 2001)

Depuis ces études, il a été démontré chez de nombreuses espèces de Mammifères que les SCN sont le siège d'une **horloge circadienne** qui contrôle un grand nombre de fonctions physiologiques et comportementales. A ce titre, les SCN sont une horloge tissulaire auto-entretenu capable de **recevoir**, **d'intégrer**, de **générer** et de **distribuer** un message circadien.

2. Réception du message circadien.

Afin de pouvoir intégrer les différentes informations de l'environnement, les SCN sont reliés à une multitude de **voies nerveuses afférentes**, transportant des messages variés dont l'intégration conduira à la synchronisation de l'horloge.

2.1. Les voies d'entrée.

En se basant sur les voies afférentes au SCN ventrolatéral, il semblerait que cette partie soit un relais d'intégration des voies afférentes aux SCN. Les neurones à VIP (peptide intestinal vasoactif), majoritaires dans cette partie des SCN reçoivent ainsi 3 projections nerveuses principales :

2.1.1. Rétine.

Les informations sur l'irradiance circadiennes sont perçues par un photopigment spécifique, la **mélanopsine**, au niveau de certaines cellules ganglionnaires (Provencio *et al.*, 1998 ; Panda *et al.*, 2002 ; Ruby *et al.*, 2002 ; Semo *et al.*, 2003). Le **tractus rétino-hypothalamique** (RHT) achemine ensuite ces informations aux SCN ainsi qu'à d'autres aires cérébrales. Ces projections sont **glutamatergiques**. Elles sont les plus importantes pour les SCN du point de vue de la synchronisation.

2.1.2. Feuilletts inter-géniculés thalamiques (IGL).

La deuxième voie d'entrée des informations lumineuses vers les SCN est indirecte : ce sont les projections des feuilletts inter-géniculés vers la partie ventrolatérale des SCN via le **tractus géniculo-hypothalamique**. Cette voie libère essentiellement du **neuropeptide Y** (NPY). Il semble que l'un des rôles de cette voie soit de moduler les informations photiques arrivant aux SCN, sachant que SCN et IGL sont innervés par les mêmes groupes de cellules ganglionnaires. Il a en outre été établi que le tractus géniculo-hypothalamique pouvait véhiculer des informations non photiques vers les SCN (Harrington, 1997).

2.1.3. Raphé.

Les **projections sérotonergiques** depuis le **raphé médian** sont la troisième voie d'entrée directe vers les SCN. Une autre projection, indirecte celle-ci, arrive du **raphé dorsal** via les IGL. Il est important de noter qu'une atteinte au système sérotonergique, par application d'agonistes ou déplétion chimique par exemple, affecte les caractéristiques des rythmes d'activité locomotrice en LD et en DD (Van Esseveldt *et al.*, 2000).

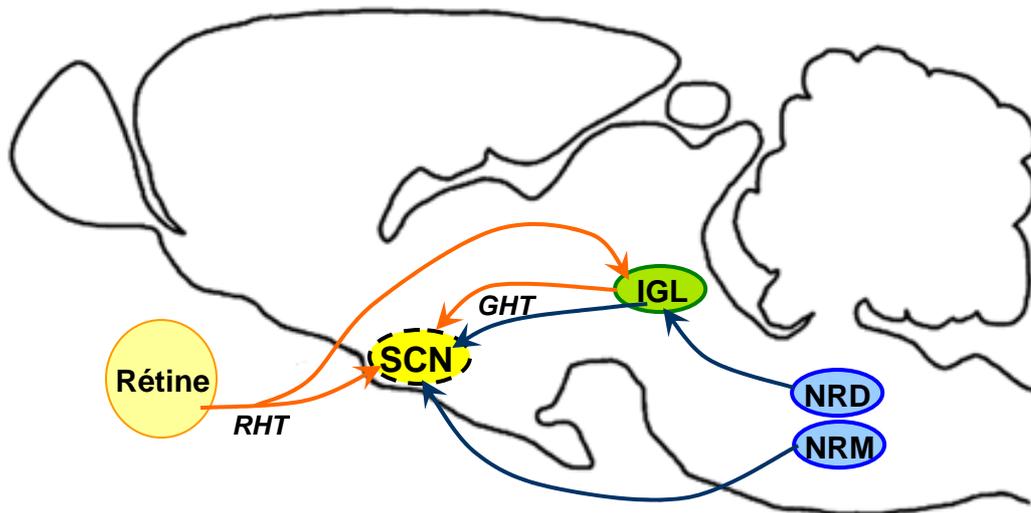


Figure 3 : Principales voies afférentes aux SCN.

Les flèches orange et bleu foncé représentent les voies convoyant des informations lumineuses (photiques) et non photiques respectivement.

NRD : noyau du raphé dorsal; IGL : feuillets inter-géniculés; GHT : tractus géniculo-hypothalamique; NRM : noyau du raphé médian; RHT : tractus rétino-hypothalamique ; SCN : noyaux suprachiasmatiques.

2.1.4. Des récepteurs.

Outre des projections nerveuses, les SCN possèdent un ensemble de récepteurs leur permettant de recevoir des informations hormonales.

2.1.4.1. Récepteurs à la mélatonine.

La **mélatonine** est une hormone sécrétée uniquement **pendant la nuit** par la glande pinéale. Ce rythme est sous contrôle des SCN. La mélatonine fournit une indication sur le moment du nyctémère (jour ou nuit) ainsi que sur la durée de la nuit puisqu'elle n'est présente qu'à ce moment. A ce titre, la glande pinéale joue un rôle crucial dans les rythmes saisonniers, rôle qui ne sera cependant pas développé ici.

La caractérisation et la localisation des **récepteurs à la mélatonine** ont donné lieu à de nombreuses études. Deux sous-types de récepteurs principaux ont été clonés : **MT1 et MT2** (Reppert *et al.*, 1995 ; Masana et Dubocovich, 2001). Si leur distribution et leur densité diffèrent entre les espèces, dans les SCN ces récepteurs sont souvent observés. Ceci suggère que les SCN seraient capables d'intégrer un **message de rétroaction** véhiculé par la mélatonine et que celle-ci pourrait moduler le système circadien (voir section 3.4.1 de cette partie).

2.1.4.2. Récepteurs métaboliques.

Les SCN sont en outre capables d'intégrer des informations métaboliques provenant de la périphérie. La **leptine** est une hormone dérivée du tissu adipeux qui régule la masse corporelle en diminuant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique. L'action de la leptine est médiée par les **récepteurs à la leptine** situés dans l'hypothalamus. Une étude immunohistochimique a démontré leur présence **dans les SCN**, suggérant que ceux-ci seraient capables de recevoir des informations du tissu adipeux (Hakansson *et al.*, 1998).

En plus de récepteurs à la leptine, il a été démontré que les SCN contiennent des récepteurs à la **ghréline** : cette hormone synthétisée par l'estomac stimule la prise alimentaire et indique une déplétion en énergie. La signalisation de cette hormone s'effectue via un récepteur, identifié par hybridation *in situ* **dans les SCN** et l'ensemble de l'hypothalamus (Zigman *et al.*, 2006). Egalement, des **récepteurs à l'insuline** ont été détectés dans les SCN. Il semble que la liaison de l'insuline sur ce récepteur permettrait de moduler la transmission synaptique et la libération de neurotransmetteurs dans le système nerveux central (Unger *et al.*, 1989).

3. Intégration du message circadien.

3.1. Les rythmes en absence de synchroniseur.

En laboratoire, il est possible de créer des conditions d'isolement total vis-à-vis de l'environnement. Les rongeurs sont alors conservés en conditions lumineuses (en général obscurité pour des rongeurs nocturnes comme le rat et la souris) et de température constantes. La nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*. Dans ce cas, les animaux présentent des rythmes persistants d'une période différente mais voisine de 24 heures (en général supérieure chez le rat et inférieure chez la souris). Ces rythmes, dits endogènes puisque persistants en conditions constantes, sont imprimés à l'organisme par les SCN et se retrouvent dans les paramètres habituellement mesurés tels que l'activité locomotrice ou la sécrétion de corticostérone. L'endogénicité d'un rythme est un pré-requis afin de pouvoir parler d'horloge et c'est l'une des caractéristiques majeures des SCN.

3.2. Comment savoir si un message a été intégré ?

Il n'est pas possible d'attester de l'intégration d'un message par les SCN sans suivre ses sorties puisque l'influence d'un facteur en entrée se répercutera sur celles-ci. En avant propos de cette partie, nous développerons l'activité locomotrice, communément utilisée comme sortie des SCN.

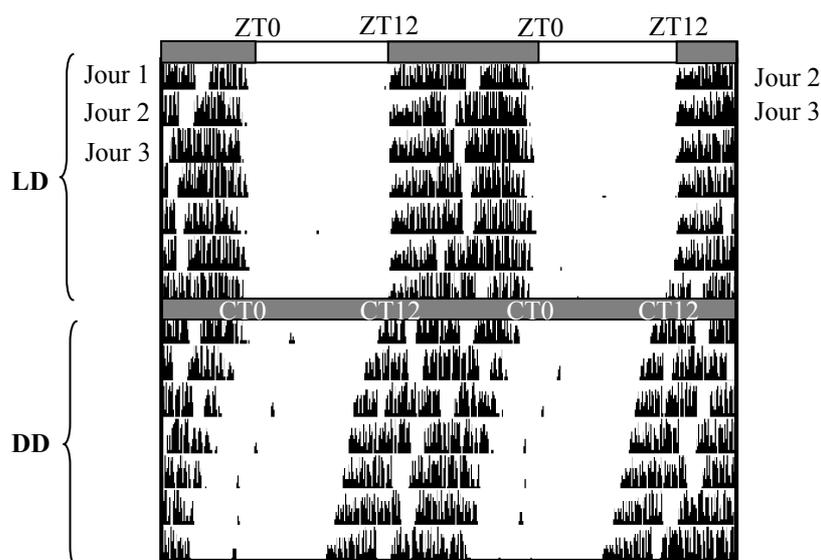


Figure 4 : Exemple d'actogramme d'un rongeur nocturne (Souris) en double représentation.

L'animal est placé dans une cage munie d'une roue ; les tours de roue sont comptabilisés par blocs de 5 minutes par un système d'acquisition. Plus le nombre de **tours de roue** est important, plus la barre noire qui les représente est haute. La compilation de ces données constitue l'**actogramme**. Celui-ci est en **double représentation** : deux jours consécutifs sont placés l'un à la suite de l'autre à la fois verticalement et horizontalement afin de faciliter la lecture.

Dans la première partie de l'actogramme, l'animal est **synchronisé** au cycle LD (light/dark : alternance du jour et de la nuit). Il y a donc un synchroniseur (la lumière). Dans ce cas, les heures astronomiques sont converties en ZT (zeitgeber time : temps du synchroniseur) : ZT0 et ZT12 correspondent au début du jour et de la nuit respectivement. Remarquer que l'animal est actif durant la nuit.

Dans la deuxième partie de l'actogramme, l'animal est en DD (dark/dark : obscurité constante) c'est-à-dire en conditions constantes, sans zeitgeber. Dans ce cas, les heures astronomiques sont converties en CT (circadien time : temps endogène). CT12 correspond au début de la nuit subjective c'est-à-dire au début de l'activité locomotrice chez les rongeurs nocturnes. CT0 est souvent déterminé par rapport à CT12 et correspond au début du jour subjectif et à la fin de l'activité locomotrice, plus difficile à déterminer. L'activité locomotrice de l'animal est ici en **libre cours** et présente une **période endogène** contrôlée par les SCN inférieure à 24 heures.

3.3. Intégration du message photique.

3.3.1. Synchronisation par la lumière

A partir du moment où l'animal est exposé à un synchroniseur pour lequel il possède une horloge capable d'intégrer les informations temporelles, les rythmes ne sont plus en libre cours. La période exprimée par les différentes sorties est alors la même que celle du synchroniseur. Pour les SCN, le synchroniseur le plus puissant est la **lumière**. Les informations en provenance du RHT vont permettre la **synchronisation photique**, c'est-à-dire par les informations lumineuses, des SCN. En cycle LD 12/12 classique, l'actogramme observé correspond à la première partie de la figure 4.

3.3.2. Créneau de lumière.

Outre le cycle LD simple, **la lumière présentée de manière ponctuelle** est intégrée par les SCN. On observe des modifications de l'activité locomotrice indiquant une intégration du message photique. Chez des rongeurs en DD, l'exposition à un créneau de lumière à différents temps circadiens (CTs) entraîne des effets sur l'activité locomotrice qui dépendent du CT d'administration. En effet, des **retards de phase**, c'est-à-dire un début plus tardif de l'activité locomotrice, sont observés si le créneau de lumière coïncide avec le **début de la nuit subjective** (à partir de CT12). Des **avances de phase** caractérisées par une activité débutant plus tôt que prévu, sont observées si l'animal est exposé à un créneau en **fin de nuit subjective** (à partir de CT18). Le signal n'entraîne aucun effet durant le jour subjectif. On peut ainsi tracer une courbe de réponse de phase qui récapitule les déphasages observés pour des créneaux de lumière administrés à différents CTs.

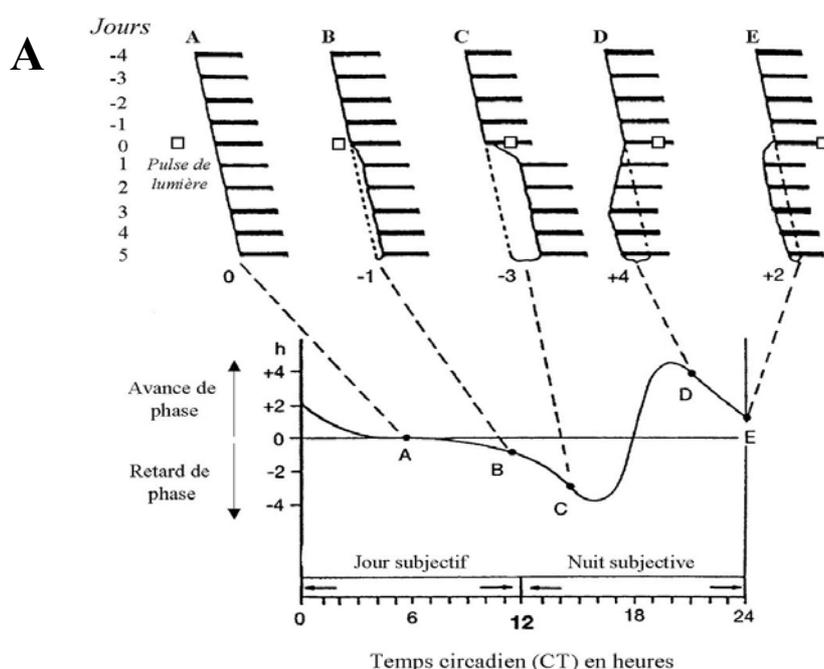


Figure 5 : Courbe de réponse de phase des stimulations photiques.

Effet d'un créneau lumineux (□) sur la phase du rythme d'activité en libre cours, chez un rongeur nocturne. 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

(Adapté de Meijer et Rietveld, 1989).

3.3.3. Décalage horaire

Lors d'expériences de **décalage horaire** sur les SCN, les animaux sont exposés à une modification du cycle LD, qui est avancé ou retardé de plusieurs heures. Dans ce cas, l'activité locomotrice ne s'exprime pas d'emblée synchronisée avec le nouveau cycle LD, mais elle **dérive** durant plusieurs jours vers le nouveau régime d'éclairément avant de se resynchroniser au nouveau cycle (Daan et Aschoff, 2001).

3.4. Synchronisation non photique.

Bien qu'il soit le plus puissant, le cycle LD n'est pas le seul synchroniseur des SCN. D'autres synchroniseurs se sont révélés capables de décaler ou d'entraîner les rythmes d'activité chez les rongeurs. Ces facteurs, dits **non photiques**, n'ont en commun que le fait d'être différents de la stimulation lumineuse, et d'un point de vue physiologique, la plupart d'entre eux induisent des **avances de phase** lorsqu'ils sont appliqués durant le **jour subjectif**. La majorité des expériences qui suivent ont été conduites en DD afin de s'affranchir de l'influence dominante du cycle LD.

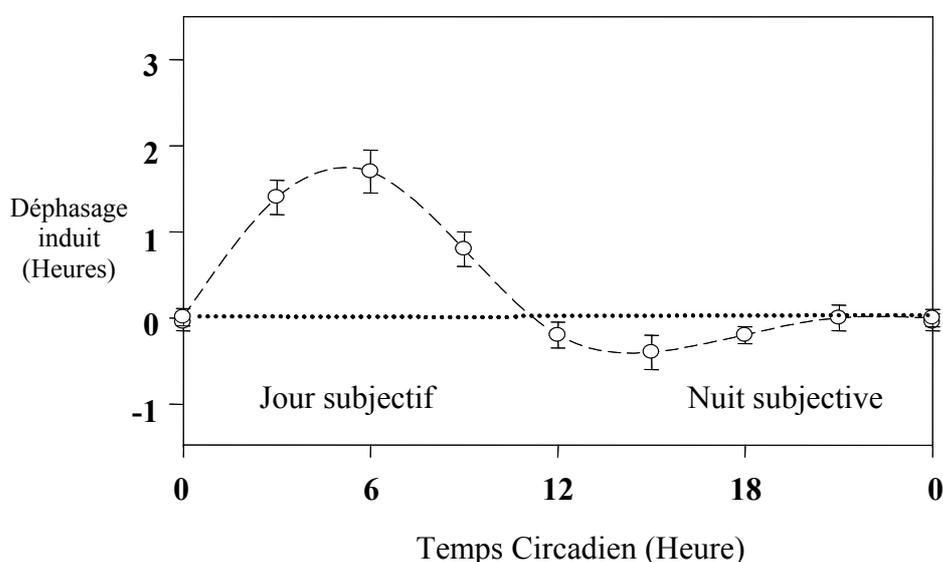


Figure 6 : Courbe de réponse de phase des effets non photiques.

Courbe de réponse de phase complète en réponse à des stimulations non photiques à différents temps du cycle veille/sommeil en obscurité constante.

(Adapté de Mrosovsky, 1996)

3.4.1. Mélatonine.

La **mélatonine**, hormone donneuse de temps par excellence, est un facteur non photique. A des **doses supra-physiologiques**, elle engendre des **avances de phase** lorsqu'elle est appliquée en fin de jour subjectif (Armstrong *et al.*, 1986). De plus, une application quotidienne de mélatonine proche du début de nuit subjective est capable de synchroniser l'horloge des SCN chez des rongeurs nocturnes (Redman *et al.*, 1983 ; Pitrosky *et al.*, 1999).

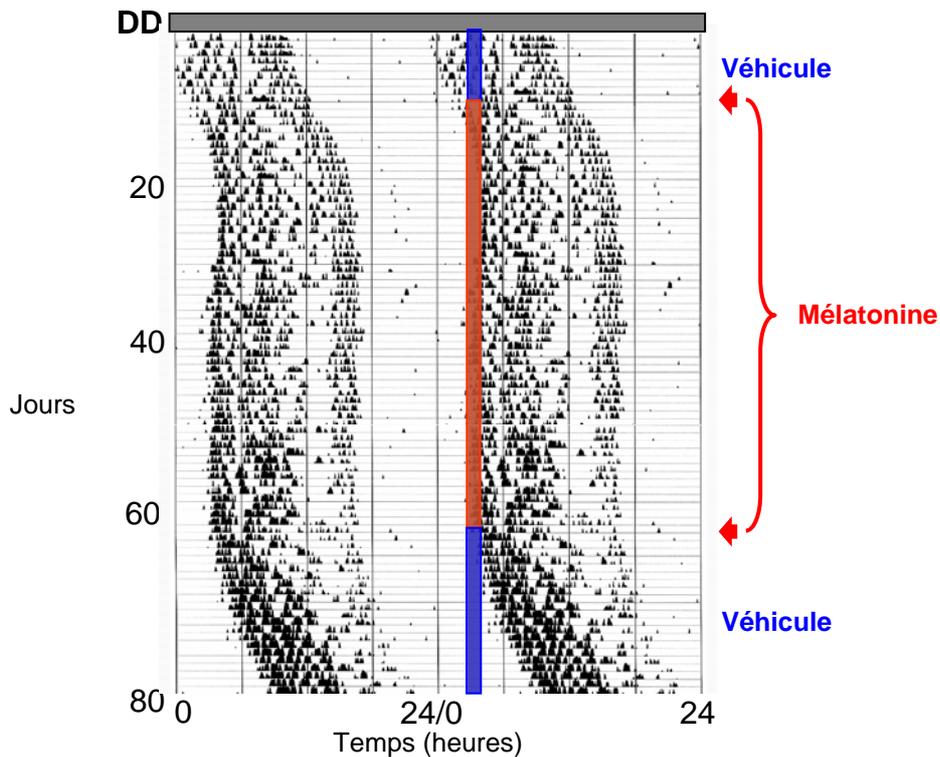


Figure 7 : Actogramme en double représentation démontrant l'entraînement des rythmes d'activité locomotrice par une perfusion quotidienne de mélatonine.

Les rats ont été placés en DD et perfusés grâce à un cathéter placé en sous cutané de manière chronique. Dans la première partie de l'actogramme, les animaux sont perfusés 1 heure par jour avec la solution véhicule sans mélatonine. Il n'y a pas de synchronisation, les rythmes restent en libre cours. Dans la deuxième partie (rectangle rouge), la mélatonine est ajoutée dans la solution de perfusion. Le rythme d'activité locomotrice est alors synchronisé au début du signal mélatoninergique. Lorsque la solution de perfusion ne contient plus de mélatonine, le rythme continue en libre cours et n'est plus synchronisé (rectangle bleu, 3^e partie de l'actogramme).

(Adapté de Pitrosky *et al.*, 1999).

3.4.2. Pharmacologie.

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

3.4.3. Comportement.

L'activation comportementale des hamsters dorés durant le jour subjectif est l'un des facteurs non photiques le mieux étudié. La procédure standard consiste à mettre à la disposition d'un hamster doré une nouvelle roue. Généralement la présence de cette roue va inciter l'animal à courir de manière soutenue à un moment inhabituel (accès à la roue durant la phase habituelle de repos), ce qui va **décaler la phase** des rythmes (Reebs et Mrosovsky, 1989 ; Bobrzynska et Mrosovsky 1998).

A l'exception de la mélatonine, ces **effets non photiques** sur l'horloge sont abolis si les **voies sérotonergiques** innervant les SCN en provenance du raphé sont détruites (Cutrera *et al.*, 1994 ; Miller *et al.*, 1996 ; Challet *et al.*, 1997a). De même, une lésion des IGL affecte les changements de phase de l'activité circadienne des SCN induits par différents stimuli non photiques (Challet *et al.*, 1996b ; Miller *et al.*, 1996 ; Schuhler *et al.*, 1999). Les **IGL** et les **noyaux du raphé** sont donc les structures directement impliquées dans la synchronisation des SCN par des facteurs non photiques.

3.4.4. Nourriture.

Le dernier facteur non photique que nous aborderons ici est la nourriture. Il est en effet critique pour la survie de tout organisme de pouvoir **s'adapter à la disponibilité alimentaire** dans son environnement. Il a été démontré que les rongeurs pouvaient modifier leur comportement afin de répondre à un accès à la nourriture dans une niche temporelle différente de celle à laquelle ils sont adaptés. Ainsi, des rongeurs comme la souris et le rat qui sont des animaux nocturnes et se nourrissent spontanément durant la nuit, sont capables de s'adapter à un accès à la nourriture durant le jour. Ils présentent alors dans les heures qui précèdent l'accès à la nourriture, une augmentation de leur activité communément appelée **activité anticipatoire** ou FAA (Food Anticipatory Activity), caractéristique de ces protocoles. Notons que la FAA n'est **pas contrôlée par les SCN** mais par une **structure oscillante extérieure aux SCN**, dont les propriétés seront développées en partie IV de cette introduction.

Même si la **restriction de l'accès à la nourriture** à quelques heures par jour affecte grandement les tissus périphériques, il n'en est pas de même pour les SCN (Damiola *et al.*, 2000 ; Stokkan *et al.*, 2001 ; voir section 5-4-2-3). Une expérience sur des tranches d'hypothalamus a notamment démontré qu'une restriction alimentaire temporelle ne modifiait pas l'activité électrique de neurones isolés dans les SCN (Shibata *et al.*, 1983). Du point de vue comportemental, des animaux placés en LL ou en DD, donc en libre cours, et restreints à quelques heures d'accès à la nourriture toutes les 24 heures, présentent à la fois une **activité contrôlée par les SCN** d'une période supérieure à 24 heures **et une FAA** d'une période de 24 heures (Mistlberger, 1994). Les deux peuvent donc co-exister.

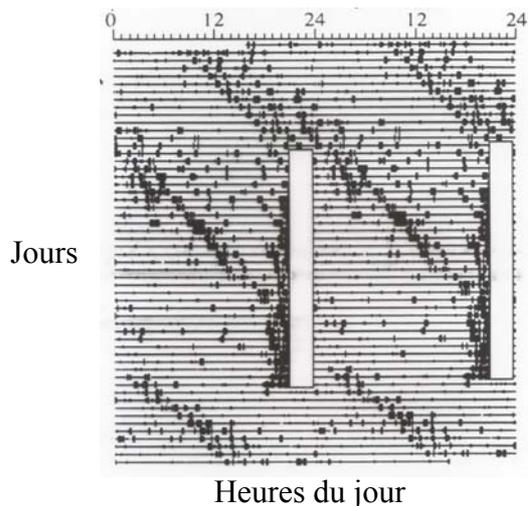


Figure 8 : Actogramme en double représentation démontrant la co-existence d'une FAA et d'une composante en libre cours.

Des rats ont été placés en lumière constante. Ils présentent une activité locomotrice en libre cours avec une période supérieure à 24 heures. Les rectangles blancs indiquent les périodes d'accès à la nourriture en cas de restriction temporelle. Les jours précédant et suivant la restriction, la nourriture est distribuée *ad libitum*. Quelques jours après le début de la restriction, les animaux présentent une FAA (composante d'anticipation). Celle-ci co-existe mais n'est pas confondue avec la période d'activité contrôlée par les SCN.

(Adapté de Mistlberger, 1994).

Plus récemment, il a été démontré que chez des rats rendus **arythmiques** par l'exposition prolongée à une **lumière constante (LL)**, une **rythmicité comportementale** peut être restaurée par une restriction alimentaire, remettant ainsi en question la relative insensibilité des SCN à la restriction temporelle (Lamont *et al.*, 2005). Il semble également que chez certaines souches de **souris domestiques** placées en LD puis en DD durant plusieurs mois, la composante en libre cours contrôlée par les SCN puisse être **synchronisée** par une restriction temporelle de l'accès à la nourriture (Castillo *et al.*, 2004). Une autre étude réalisée en DD, comparant des souris de la **souche CS** à des C57BL/6J, démontre que chez les premières les SCN sont **entraînés par une restriction temporelle** de l'accès à la nourriture alors que ce n'est pas le cas pour la deuxième souche (Abe *et al.*, 1989). Encore une fois, ce phénomène est limité à une souche particulière de souris. Dans ce type de protocoles, les animaux ont accès à une quantité de nourriture comparable à la condition *ad libitum* et par conséquent **ne perdent pas de poids**. Il n'y a pas de restriction calorique.

Si la restriction temporelle n'est capable d'influer sur les SCN que dans des conditions très strictes ou pour des souches particulières, il n'en est pas de même lorsque les animaux sont soumis à une **restriction calorique**. Une ration quotidienne hypocalorique, c'est à dire inférieure à la ration normocalorique, est fournie à heure fixe à l'animal. Dans ce cas, le début du pic nocturne de sécrétion de **mélatonine** est **avancé** de deux heures (Challet *et al.*, 1996a ; Mendoza *et al.*, 2005c). Des altérations dans le rythme de mélatonine plasmatique et pinéale avaient en outre déjà été observées par d'autres auteurs (Holloway *et al.*, 1979 ; Chik *et al.*,

1987). Le timing du pic nocturne de **corticostérone** reste plus ou moins inchangé, mais un **second pic, en anticipation** de l'accès à la nourriture apparaît. La composante nocturne de l'activité locomotrice est quant à elle avancée de 6 heures, commençant ainsi dès le milieu de la phase éclairée (Challet *et al.*, 1997c). Ces résultats indiquent que les **SCN peuvent être influencés par des facteurs métaboliques** en général et par une restriction de l'accès à la nourriture, puisque la relation de phase avec le cycle LD peut être modifiée par un nourrissage hypocalorique.

3.5. Limites de l'entraînement.

Les SCN ont une **période endogène proche de 24 heures** et propre à chaque individu, qui s'exprime en **conditions constantes**. Un zeitgeber avec une période T peut entraîner les rythmes circadiens de sorte que les rythmes contrôlés par les SCN vont avoir une période égale à T. Cet entraînement n'est possible que si T est suffisamment proche de la période endogène. Il y a donc des **limites** au delà desquelles les SCN ne peuvent pas être entraînés. Chez le rat par exemple, la période endogène est en général légèrement plus longue que 24 heures. Les limites de l'entraînement sont déterminées par l'exposition des animaux à des **cycles T**, c'est à dire des jours de durée croissante de 22 heures (LD 11/11, soit 11 heures de jour et 11 heures de nuit) à 27 heures (LD 13.5/13.5). Il a ainsi été démontré que les limites de l'entraînement des SCN par la lumière se situaient entre **22.5 et 26 heures**. Si l'on se trouve au delà de ces fourchettes d'entraînement, les rythmes « décrochent » et n'ont plus une période identique à celle de l'alternance du jour et de la nuit (Daan et Aschoff, 2001).

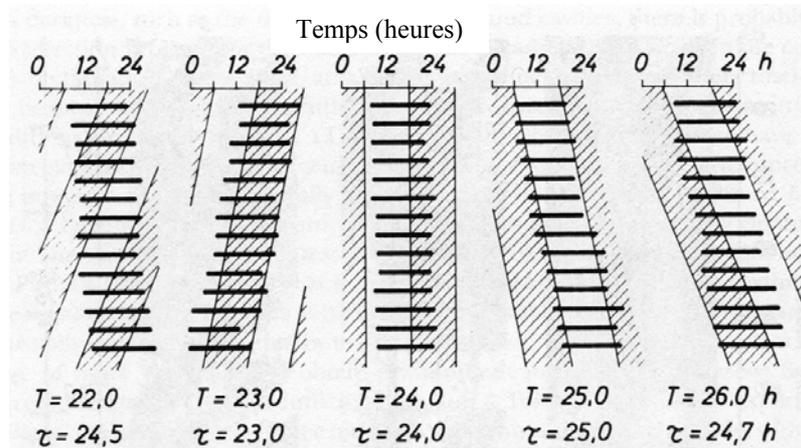


Figure 9 : Représentation schématique des limites de l'entraînement des SCN par la lumière. Les différents schémas représentent des actogrammes en simple représentation où la barre noire correspond à la période d'activité de l'animal. Les zones alternativement hachurées et blanches représentent les périodes obscures et éclairées respectivement. La période T est la période du zeitgeber. τ est la période mesurée de l'activité locomotrice. Si $\tau = T$, alors l'animal est entraîné (T = 23 ou 25 h). Si $\tau \neq T$ alors on est en dehors des limites de l'entraînement (T = 22 ou 26 h). Ici, l'animal représenté n'est pas entraîné par un cycle T de 26 heures, alors qu'en général, la plupart des rats en sont capables.

(Adapté de Daan and Aschoff, 2001).

4. Elaboration du message circadien.

4.1. Origine moléculaire : les gènes horloges.

A partir des années 90, un ensemble de gènes horloges ont été identifiés comme acteurs des boucles moléculaires de rétroaction qui génèrent les oscillations circadiennes dans les SCN.

4.1.1. Boucle positive.

C'est par une stratégie de génétique inverse que l'équipe de Takahashi a mis en évidence en 1994, une mutation sur la séquence d'ADN codant pour la protéine **CLOCK** : Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Vitaterna *et al.*, 1994). Une mutation ponctuelle transformant un A en T au niveau d'un site d'épissage supprime un exon et ampute la protéine *Clock* de 51 acides aminés dans la zone de transactivation (King *et al.*, 1997). Cette mutation affecte peu la synchronisation des souris au cycle LD. En DD, la période endogène des souris hétérozygotes est significativement plus longue (24.8 h) que celle des souris sauvages (23.7 h). Les souris **homozygotes** présentent une période très longue allant de 26 à 29 heures et deviennent le plus souvent **arythmiques** si les conditions constantes persistent.

En 2000, Bunger et collaborateurs identifient un autre acteur essentiel dans la génération des rythmes circadiens : ***Bmal1***. Tout comme *Clock*, c'est un **facteur de transcription** de la famille des protéines à domaine **bHLH-PAS** (basic Helix-Loop-Helix ; Period Arnt1 Sim).

La perte de *Bmal1* a pour conséquence une diminution de l'activité générale de l'animal ainsi qu'une altération de la synchronisation au cycle LD. Lors d'un transfert en obscurité constante, ces souris deviennent immédiatement **arythmiques** (Bunger *et al.*, 2000 ; voir également Abe *et al.*, 1998).

Le point de départ des oscillations circadiennes dans les SCN est l'hétérodimère **CLOCK/BMAL1** qui est transloqué dans le noyau où il se fixe à l'ADN grâce aux domaines bHLH des protéines CLOCK et BMAL1, ce qui **active la transcription** des gènes de la boucle négative et des gènes contrôlés par l'horloge (CCG) via une séquence **E-box** (Gekakis *et al.*, 1998 ; Hoogenesch *et al.*, 1998).

L'ARNm de *Bmal1* est exprimé rythmiquement dans les SCN avec un maximum d'expression durant la nuit subjective (CT 14-18). Il est également exprimé dans de nombreuses structures du système nerveux central et dans les tissus périphériques, avec des phases plus ou moins retardées par rapport aux SCN (Honma *et al.*, 1998 ; Oishi *et al.*, 2000). **BMAL2**, un analogue de BMAL1 est lui aussi exprimé dans les SCN ; il aurait une fonction redondante avec BMAL1 (Hoogenesch *et al.*, 2000 ; Ikeda *et al.*, 2000).

L'ARNm de *Clock* n'est quant à lui pas exprimé de manière rythmique dans les SCN (Shearman *et al.*, 1999 ; Zheng *et al.*, 1999).

4.1.2. Boucle négative.

4.1.2.1. Les gènes *Per* et *Cry*.

Les gènes ***Period*** (*Per*) ont été identifiés par homologie de séquence avec le gène *Period* cloné chez la Drosophile. Ils sont au nombre de trois : *Per1*, *Per2* et *Per3* (Zylka *et al.*,

1998b ; Zheng *et al.*, 2001). Les protéines **PER** forment le premier composant de la **boucle négative**, qui est complétée les protéines **CRY** (Field *et al.*, 2000), avec lesquelles les PER dimérisent via des domaines PAS (Hastings *et al.*, 1999). Les gènes *Cryptochrome* (*Cry*) sont au nombre de deux : *Cry1* et *Cry2*.

Il semblerait que les dimères **PER-CRY** aient à la fois une **action inhibitrice** sur leur propre transcription par interaction directe avec le dimère CLOCK-BMAL1 (Lee *et al.*, 1999 ; Bae *et al.*, 2000) et une action activatrice sur la transcription de BMAL1 via une inhibition de la transcription de REV-ERB alpha (Preitner *et al.*, 2002).

Dans les SCN, le maximum d'expression de l'ARNm de *Per1* est observé vers ZT2-6, celui de *Per2* à ZT8-12 et celui de *Per3* à ZT6-ZT9 (Sun *et al.*, 1997 ; Tei *et al.*, 1997 ; Zylka *et al.*, 1998b ; Hastings *et al.*, 1999). Les protéines PER suivent les profils des ARNm avec un délai de 4 à 6 heures (Field *et al.*, 2000). Le pic d'expression de *Cry1* et de *Cry2* se situe aux alentours de ZT10-12 (Okamura *et al.*, 1999).

Les gènes *Per* sont non seulement exprimés dans les SCN, mais aussi dans de nombreuses autres structures cérébrales et tissus périphériques (Sun *et al.*, 1997).

4.1.2.2. Mutants simples.

Les **mutants *Per1*** présentent une période circadienne plus courte et plus instable (autour de 22.6 heures) que les souris sauvages (23.7 heures). Ils **conservent une rythmicité** circadienne en DD (Cermakian *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2001). Ces mutants ne peuvent pas produire d'avances de phase de l'activité locomotrice suite à un créneau de lumière en conditions d'entraînement par un cycle LD 12/12 (Albrecht *et al.*, 2001).

Les **mutants *Per2*** présentent une délétion dans la zone codant pour le domaine PAS d'interaction protéine/protéine. En DD, ils présentent une période très courte d'environ 22.1 heures et **deviennent arythmiques** en 2 à 18 jours (Zheng *et al.*, 1999 ; Bae *et al.*, 2001). Il est à noter que, contrairement aux souris sauvages, ces mutants restent **rythmiques en LL**, avec une période positivement corrélée à l'augmentation de l'irradiance (Steinlechner *et al.*, 2002). Concernant les réponses à la lumière, les mutants *Per2* entraînés en LD 12/12 ne semblent plus capables de réaliser des retards de phase de l'activité locomotrice en réponse à un créneau de lumière en début de nuit (Albrecht *et al.*, 2001).

L'invalidation du **gène *Per3*** ne semble **pas avoir de conséquence** notable du point de vue comportemental (Shearman *et al.*, 2000a).

Les souris KO pour le **gène *Cry1* ou le gène *Cry2*** ne semblent pas présenter d'altérations comportementales en LD 12/12. Par contre, lorsqu'elles sont placées en obscurité constante, les KO *Cry1* **ont une période endogène** significativement **plus courte** que les WT (22.5 contre 23.8 heures pour les WT) alors que les mutants *Cry2* **ont une période endogène plus longue** (24.6 heures) (Van der Horst *et al.*, 1999 ; Vitaterna *et al.*, 1999). Les réponses à un créneau de lumière en début de nuit sont altérées et l'on observe des retards de phase plus importants que chez les WT (Spolestra *et al.*, 2004).

4.1.2.3. Doubles mutants

L'invalidation combinée des gènes *Per1* et *Per2* a pour conséquence la **perte immédiate de rythmicité** en DD (Zheng *et al.*, 2001). Par contre, les phénotypes des souris *Per1/Per3* ou *Per2/Per3* sont quasi identiques aux phénotypes des souris simples mutantes *Per1* ou *Per2* respectivement (Bae *et al.*, 2001).

Les souris **double KO pour les gènes *Cry*** sont **arythmiques d'emblée** lorsqu'elles sont placées en DD. En LD 12/12 cependant, leur activité est masquée par la lumière et elles restent rythmiques (Van der Horst *et al.*, 1999).

La délétion additionnelle du gène *Cry2* chez des souris mutantes *Per2* a pour conséquence une **restauration d'un phénotype circadien** semblable à celui des souris **WT**. Contrairement aux mutants *Per2*, les doubles mutants *Per2/Cry2* sont rythmiques en DD. Inversement, les souris mutantes *Per2/Cry1* sont **arythmiques d'emblée** en DD (Oster *et al.*, 2002). Les doubles mutants *Per1/Cry1* sont **rythmiques** en DD et ont une période endogène proche de celle des WT. Les modifications les plus subtiles du comportement ont été observées chez les souris *Per1/Cry2* mutantes, qui ont des rythmes perturbés en LD mais ne deviennent **arythmiques** en DD qu'à partir de **l'âge de 6 à 12 mois** (Oster *et al.*, 2003a).

4.1.2.4. Triples mutants.

Suite aux études sur les doubles mutants *Per/Cry*, Oster et collaborateurs ont testé le phénotype circadien de diverses combinaisons de **triples mutants *Per/Cry***. Dans aucun des cas étudiés, ils n'ont observé de persistance d'un rythme circadien en DD (Oster *et al.*, 2003b). Les auteurs démontrent ainsi **qu'un seul des gènes *Per* ou *Cry* est insuffisant pour soutenir le fonctionnement rythmique des SCN**.

4.1.3. Boucles intermédiaires.

En 2002, Preitner et collaborateurs identifient dans le promoteur de *BMAL1* des séquences **RORE** (Retinoic acid related Orphan Receptors response Element), reconnues par des protéines membres de la famille des récepteurs orphelins, parmi lesquelles REV-ERB et ROR.

4.1.3.1. *Rev-erb*.

Chez des souris *Rev-erba*^{-/-}, l'expression de *Bmall* dans les SCN est **constitutivement élevée**, ce qui indique un **rôle régulateur négatif de REV-ERBα** sur la transcription de *Bmall*. L'expression de *Per2* et *Cry2* est par contre quasi inchangée, ce qui pourrait expliquer que ces souris restent **rythmiques en DD et en LL**, mais avec des périodes plus courtes que les WT (Preitner *et al.*, 2002). Le rôle inhibiteur de REV-ERBα est confirmé par le moment d'expression maximale de sa **protéine** dans les SCN chez des souris WT (ZT3-6), en **opposition de phase avec l'ARNm de *Bmall*** (Preitner *et al.*, 2002).

En ce qui concerne l'initiation de la transcription de *Rev-erba*, elle est activée par le dimère CLOCK/BMAL1 via des **E-box** situées dans son promoteur (Triqueneaux *et al.*, 2004).

Il existe également un gène *Rev-erb β* dont la protéine est capable d'inhiber la transcription de *Bmal1* (Guillaumond *et al.*, 2005). Il présente un rythme journalier de transcription avec un maximum d'expression à ZT6-10 (Preitner *et al.*, 2002 ; Guillaumond *et al.*, 2005).

4.1.3.2. *Ror*.

Le gène *Rora* est exprimé ubiquitairement dans l'organisme (Akashi et Takumi, 2005). Dans les SCN, il est rythmique et présente un maximum autour de **ZT8** (Ueda *et al.*, 2002). Tout comme REV-ERB α , **ROR α agit sur la transcription de *Bmal1* via une boîte RORE**, mais cette fois en **l'activant** (Sato *et al.*, 2004). Il constitue ainsi une boucle intermédiaire qui permettrait de **réinitialiser la transcription de la boucle positive**. La transcription de *rora* pourrait quant à elle être activée par le dimère CLOCK/BMAL1 via une E-box (Sato *et al.*, 2004).

Ror β est exprimé exclusivement dans le cerveau, et particulièrement dans les SCN, la rétine et la glande pinéale. Il présente un rythme d'expression avec un **pic vers ZT4** (Sumi *et al.*, 2002).

Rory n'est exprimé que dans quelques tissus périphériques et son rôle circadien exact reste à élucider (Guillaumond *et al.*, 2005).

Les **souris KO pour le gène *Rora***, les « *staggerer* », malgré une ataxie cérébelleuse rendant difficile la mesure d'activité locomotrice, semblent avoir une **période endogène plus courte que les WT** en DD. En outre, l'expression de *Bmal1* est sérieusement altérée chez ces mutants (Steinmayr *et al.*, 1998 ; Sato *et al.*, 2004).

Les **souris KO pour le gène *Ror β*** , dites « *vascillans* », sont de petite taille, présentent un faible tonus musculaire et sont aveugles (André *et al.*, 1998). Elles demeurent **rythmiques en DD** avec cependant une **période endogène légèrement plus longue que les WT**.

4.1.4. D'autres partenaires possibles ?

4.1.4.1. *Tim*.

Ce gène a été cloné par **homologie avec le gène *Tim*** présent chez la drosophile où sa protéine dimérise avec PER (Zylka *et al.*, 1998a). Il est peu exprimé dans les SCN chez les rongeurs, son ARNm n'oscille pas et il n'est pas inductible par la lumière. Il ne semble pas non plus interagir avec les protéines PER. Etant donnée son expression robuste dans la *pars tuberalis*, la rate et les testicules, il pourrait intervenir dans la **signalisation de la mélatonine**, peut-être au niveau saisonnier.

4.1.4.2. *DEC*

DEC1 (differentiated embryo chondrocyte protein) et **DEC2** sont des protéines à **domaine bHLH**. Leurs ARNm sont exprimés rythmiquement dans les SCN avec un maximum en **début de jour subjectif** (Honma *et al.*, 2002 ; Grechez-Cassiau *et al.*, 2004). Il semble que les DEC soient capables **d'inhiber la transactivation du gène *Per1*** par le dimère CLOCK/BMAL1 en entrant en compétition avec CLOCK/BMAL1 sur les E-box et/ou qu'ils interagissent directement avec BMAL1 (Hamagushi *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2004).

4.1.5. Régulations pré et post traductionnelles.

En plus des boucles de rétrocontrôle des gènes horloges, beaucoup d'autres acteurs semblent intervenir dans la génération des oscillations circadiennes. De nombreuses études ont montré des **régulations géniques** comme la régulation de la **forme de la chromatine** par les histones, des régulations **transcriptionnelles** (*enhancers*, *silencers*) ou encore des régulations **post-traductionnelles** comme les **phosphorylations** (Caséine kinases 1) ou les **SUMOylations** des protéines horloges, leur dégradation spécifique et la formation de dimères (pour revue Reppert et Weaver, 2002 ; Lowrey et Takahashi, 2004).

L'un des exemples de l'importance de ces régulations est la **mutation « tau »** : En 1988, Ralph et Menaker découvrent chez le hamster doré, une mutation spontanée **réduisant la période endogène** de 24 heures environ chez les WT, à 22 heures chez les mutants hétérozygotes et à 20 heures chez les homozygotes (Ralph et Menaker, 1988). Ce phénotype est la conséquence d'une **mutation ponctuelle sur la caséine kinase 1 epsilon (CK1 ϵ)** qui perd la capacité à phosphoryler PER (Lowrey *et al.*, 2000).

4.2. Modèle moléculaire.

En bref, les gènes *Clock* et *Bmal1* sont transcrits puis traduits. Leurs protéines hétérodimérisent et vont activer la transcription des gènes *Per* et *Cry*, *ror* et *rev-erb* ainsi que des CCG. Ces derniers sont considérés comme des sorties de l'horloge et seront abordés dans la section II.5.2.

Les ARNm de *Per* et *Cry* sont traduits dans le cytoplasme, où les protéines dimérisent. Elles peuvent éventuellement faire l'objet de modifications post traductionnelles (par exemple les phosphorylations des protéines *PER* par les Caséine Kinases 1 ϵ/δ (*CK1 ϵ/δ*)). Les dimères *PER/CRY* sont transloqués dans le noyau où ils inhibent leur propre transcription. Dans le même temps, les protéines *REV-ERB* viennent inhiber la transcription de *Bmal1*, alors que les *ROR* vont réinitier cette transcription.

Ces cycles qui évoluent sur 24 heures environ sont responsables de la génération des oscillations circadiennes dans les SCN (Shearman *et al.*, 2000b ; Ko et Takahashi, 2006, pour revue).

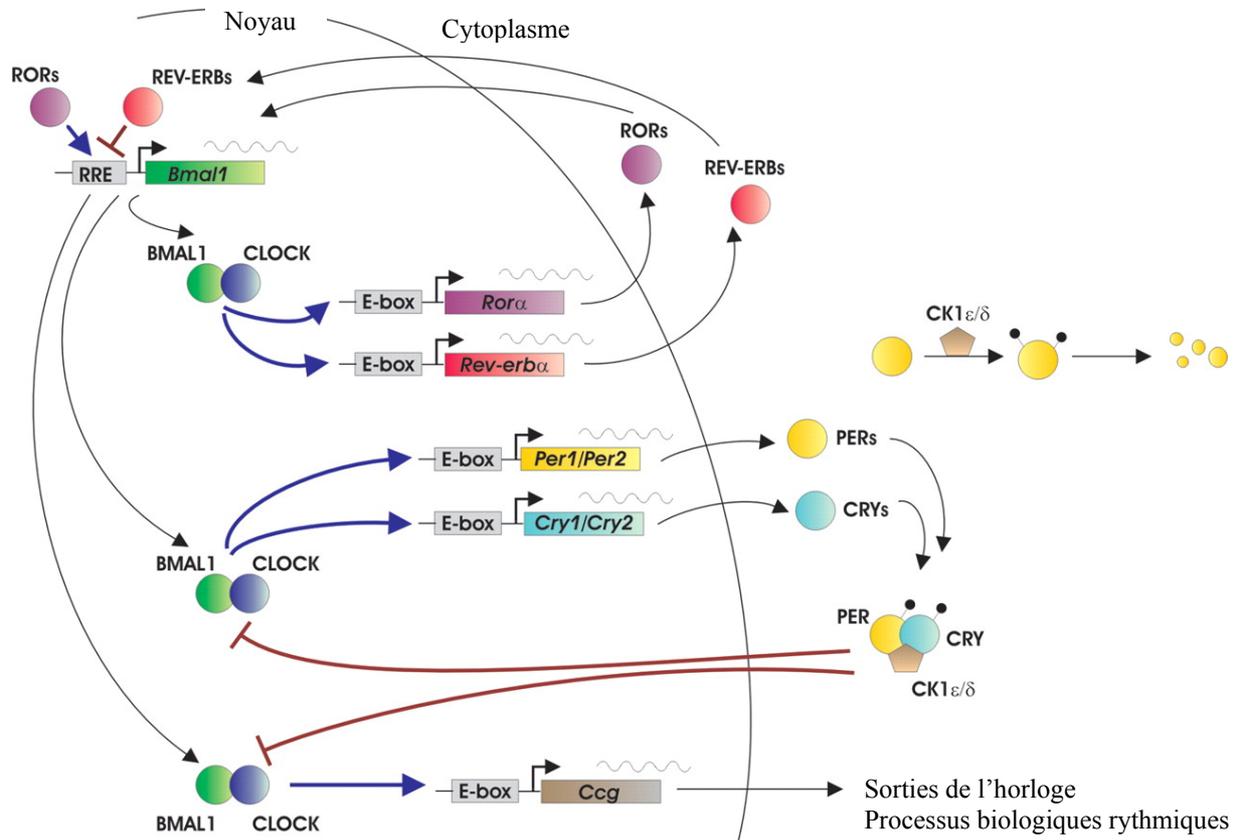


Figure 10 : Modèle des boucles moléculaires de régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes horloges chez les Mammifères.

Un dimère de facteurs de transcription CLOCK/BMAL1 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 probablement *Rorα* (présence d'une E-box à démontrer). D'autres gènes possèdent des E-boxes et sont aussi sous le contrôle transcriptionnel de CLOCK/BMAL1. L'ensemble de ces gènes est regroupé sous le nom de CCG (*Clock* controlled genes ou gènes contrôlés par l'horloge). Les protéines PER et CRY (en association possible avec DEC ne figurant pas ici) 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 CLOCK/BMAL1. 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.

(Adapté de Ko et Takahashi, 2006)

5. Distribution du message circadien.

Une fois qu'ils ont reçu, intégré et élaboré un message circadien, les SCN distribuent ce message à un ensemble de sorties. L'activité locomotrice est probablement la plus étudiée et elle a déjà été développée en section 3 de cette introduction. Mais elle n'est pas la seule sortie mesurable des SCN.

5.1. Puissance des SCN.

En 1972, Stephan et Zucker établissent que **les SCN sont nécessaires à l'expression du rythme d'activité locomotrice** (Stephan et Zucker, 1972). Cependant, ces expériences n'ont pas pu apporter la preuve formelle que les SCN étaient le siège d'un oscillateur endogène, mais tout au plus un **relais obligé** dans le contrôle de ces activités rythmiques.

En 1990, Ralph et collaborateurs démontrent que chez des hamsters dorés de type sauvage rendus arythmiques par une **lésion bilatérale des SCN**, la transplantation d'un **greffon de SCN** prélevé chez des mutants *tau* restaure une **rythmicité circadienne** avec la période phénotypique de la souche *tau* (Ralph *et al.*, 1990). Ces résultats démontrent que la période endogène du donneur est « imprimée » à au moins l'une des sorties habituelles du receveur et ainsi que **les SCN sont réellement le siège de l'horloge circadienne principale** (Ralph *et al.*, 1990 ; Sollars *et al.*, 1995 ; Boer *et al.*, 1998).

5.2. Sorties moléculaires (CCG = Clock Controlled Genes).

5.2.1. AVP.

La **vasopressine** (ou arginine vasopressine : AVP) est un neuropeptide dont l'ARNm est régulièrement utilisé en hybridation *in situ* comme CCG, et plus particulièrement comme **marqueur moléculaire de la phase de sortie de l'horloge**. Il est d'ailleurs considéré ici comme tel, sachant qu'il possède une **E-box dans son promoteur** et que la transcription de son ARN messenger peut être régulée positivement par le dimère CLOCK/BMAL1 (Jin *et al.*, 1999). Le rôle précis de l'AVP dans les SCN reste assez obscur. L'AVP ne serait **pas indispensable pour l'expression de la rythmicité circadienne au sein des SCN**, mais l'élimination sélective des neurones à AVP a pour conséquence une perte de la rythmicité dans la prise hydrique chez le rat. Il semblerait donc que la sécrétion rythmique de l'AVP soit une sortie de l'horloge (Van Esseveldt *et al.*, 2000). L'ARNm de l'AVP présente un rythme d'expression aussi bien en LD qu'en DD, avec un **pic en début de jour subjectif** (Jin *et al.*, 1999).

5.2.2. DBP.

L'*albumin D-element binding protein* ou **DBP** a été d'abord identifié dans le foie et nombre d'autres tissus périphériques. Il appartient à une famille de **facteurs de transcription**, à laquelle appartiennent également les gènes d'expression précoce FOS et JUN (Mueller *et al.*, 1990). L'expression de DBP est rythmique dans le foie ainsi que dans la plupart des tissus périphériques, chez la souris et le rat. Il oscille avec une grande amplitude dans les SCN avec un **maximum d'expression à ZT5** (Lopez-Molina *et al.*, 1997). L'activation de la transcription de DBP s'effectue via des E-boxes, indiquant sa nature de CCG (Ripperger *et al.*, 2000). Les **souris KO pour DBP** présentent une diminution de la quantité d'activité locomotrice. Lorsqu'elles sont placées en DD, ces souris sont **rythmiques** et leur **période de libre cours est plus courte** que celle de souris WT (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

5.3. Neurotransmetteurs, neuropeptides, peptides.

5.3.1. Neurotransmetteurs.

La plupart des neurones des SCN sont **GABAergiques** et possèdent des récepteurs pour ce neurotransmetteur (Moore et Speh, 1993). De plus, une libération de **glutamate** par les neurones des SCN dans les PVN a pu être identifiée (Perreau-lenz *et al.*, 2004).

5.3.2. Neuropeptides.

5.3.2.1. VIP

Les niveaux d'ARN et de protéines du **vasoactive intestinal peptide** (VIP) présentent, chez le rat, un **rythme** journalier **en LD** dans les SCN, avec un pic durant la nuit. Par contre, l'expression du VIP est **constante en DD**. Il ne serait nécessaire ni à la génération des rythmes dans les SCN ni à la transmission du message rythmique des SCN vers ses cibles (Van Esseveldt *et al.*, 2000). Des études récentes du groupe de Hastings démontrent que des souris KO pour le gène codant pour le VIPR, récepteur du VIP, deviennent arythmiques. Cependant, une analyse fine de l'expression de *Per2* (suivie par un rapporteur luciférase) dans des neurones individuels des SCN révèle qu'ils demeurent rythmiques. Cette étude démontre **l'implication essentielle du VIP dans la synchronisation des neurones des SCN entre eux**, via les récepteurs VIPR (Maywood *et al.*, 2006).

5.3.2.2. Autres

La **somatostatine** présente un **rythme d'expression dans les SCN** aussi bien LD qu'en DD. Les projections de ces neurones se limitent à l'intérieur des SCN et la fonction dans l'horloge de ces neurones reste inconnue.

Le **Gastrin releasing peptide** (GRP) présente un **rythme journalier en LD**, dont le pic est en antiphasse avec le VIP (durant le jour). Sachant que les neurones à GRP projettent à l'extérieur des SCN, il est possible qu'ils **véhiculent des informations photiques** vers d'autres aires cérébrales. Ce fait n'est cependant pas démontré (Van Esseveldt *et al.*, 2000).

5.3.3. Peptides

Les SCN sont responsables de la génération des rythmes et de la redistribution de ces rythmes à des fonctions physiologiques et comportementales. Parmi elles, l'activité locomotrice serait contrôlée en partie *via* des facteurs sécrétés par les SCN qui agiraient localement dans l'hypothalamus. Cette hypothèse émane des expériences de restauration des rythmes par transplantation de SCN fœtal chez un animal SCN lésé.

5.3.3.1. TGF.

En 2001, l'équipe de Weitz identifie le **Transforming growth factor- α** (TGF- α) comme un probable facteur inhibiteur de l'activité locomotrice, sécrété par les SCN. En effet, il est exprimé de manière **rythmique** dans les SCN, avec un large pic durant le jour. Une infusion de TGF α dans le 3^e ventricule **inhibe l'activité locomotrice de manière réversible**. Cette action passe par le récepteur pour **l'EGF** (epidermal growth factor) qui se trouve dans la **zone subparaventriculaire** de l'hypothalamus. En outre, des souris mutantes pour ce récepteur présentent une activité diurne anormalement élevée. Le TGF α , via son récepteur, serait donc possiblement impliqué dans l'inhibition diurne de l'activité locomotrice (Kramer *et al.*, 2001).

5.3.3.2. PK2.

Plus récemment, il a été démontré que la **prokinéticine 2** (PK2), aurait le même effet que le TGF α . Celle-ci est exprimée de manière **rythmique** dans les SCN avec un maximum en début

de jour. Les **récepteurs pour PK2** se trouvent dans les principales **structures cibles des SCN**, ce qui renforce l'hypothèse. Ici encore, l'administration intracérébroventriculaire de PK2 durant la nuit subjective **inhibe l'activité locomotrice** ; cependant, l'absence de récepteurs à PK2 dans ces zones rend l'interprétation de ce résultat délicate. La transcription de l'ARNm de PK2 pourrait être activée par le dimère CLOCK/BMAL1 via un **E-box** contenue dans son promoteur ; cela accroît la possibilité que PK2 soit un **CCG** capable de contrôler des sorties de l'horloge, ou en tous cas d'influer dessus (Cheng *et al.*, 2002).

5.3.3.3. *CLC*.

L'équipe de Weitz récidive en 2006 et présente un nouveau facteur sécrété par les SCN et inhibant possiblement l'activité locomotrice diurne. La **Cardiotrophin-Like Cytokin (CLC)** semble avoir toutes les qualités requises : elle est exprimée dans les SCN, dans une sous-population de neurones à AVP. Cette expression est **rythmique**, avec un maximum en fin de jour, à un moment où les rongeurs nocturnes sont inactifs. Les **récepteurs** au CLC se trouvent sur les parois du **3^e ventricule** et une infusion de CLC bloque transitoirement l'activité locomotrice sans affecter l'horloge (Kraves et Weitz, 2006).

Cette expérience ne réfute cependant pas les précédentes et il est fort probable que l'activité locomotrice soit contrôlée par les SCN via de multiples facteurs qui agissent de concert.

5.3.4. Régionalisation des SCN.

Du point de vue morphologique, les SCN peuvent être subdivisés en une partie **dorsomédiale** et une partie **ventrolatérale**. Chaque partie des SCN exprime un ensemble de neuropeptides distincts. Ainsi, dans la partie **dorsomédiale**, les neurones expriment majoritairement de **l'AVP** ; les neurones de la partie **ventrolatérale** expriment quant à eux le **VIP** et/ou le **GRP**. Une population plus réduite de neurones à **somatostatine** se trouve entre ces deux populations majoritaires.

Un certain nombre d'autres substances ont été identifiées par immunohistochimie (Angiotensine II, galanine, substance P, calbindine) mais ne seront pas développées plus avant.

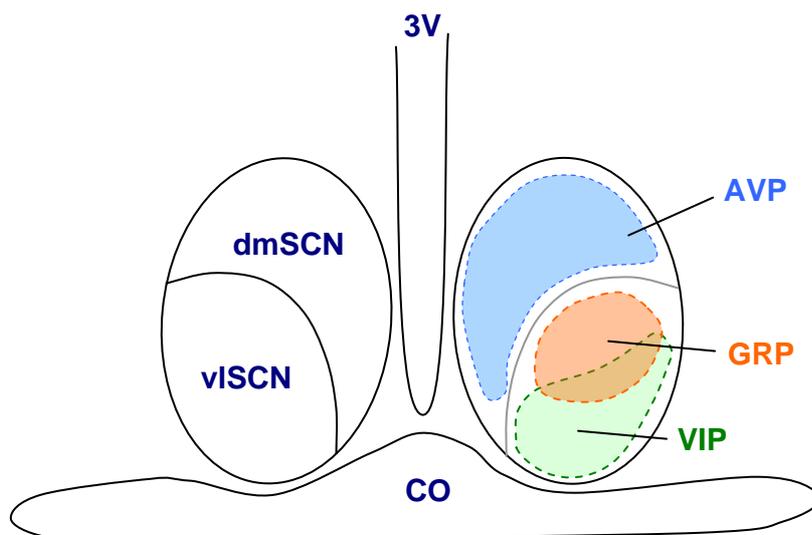


Figure 11 : Subdivisions des SCN et représentation simplifiée des neuropeptides.

Les subdivisions des SCN sont représentées sur la partie gauche. La distribution des neuropeptides principaux ainsi que des neurotransmetteurs est représentée sur la partie droite. 3V : 3^e ventricule; AVP : arginine vasopressine (bleu); dmSCN : SCN dorsomédial; GRP : gastrin-releasing peptide (orange); CO : chiasma optique; VIP : vasoactive intestinal peptide (vert); vlSCN : SCN ventrolatéral.

5.4. Relation gènes horloges / comportement.

5.4.1. Réponse photique.

5.4.1.1. Créneau de lumière.

Les SCN sont entraînés par la lumière et il n'est pas étonnant de constater que la lumière ait un effet sur certains des gènes de l'horloge. Ainsi, l'expression de trois d'entre eux est **inductible par la lumière** : *Per1* (Shigeyoshi *et al.*, 1997), *Per2* (Sherman *et al.*, 1997) et *Dec1* (Honma *et al.*, 2002). Leur induction est rapide et a lieu durant la nuit subjective. *Per1* et *Dec1* sont induits indifféremment durant toute la nuit subjective (Honma *et al.*, 2002), alors que *Per2* n'est induit fortement que si le créneau lumineux est présenté en début de nuit subjective (Albrecht *et al.*, 1997 ; Zheng *et al.*, 2001). Ces gènes horloge seraient donc **acteurs des décalages de phase** observés en réponse aux diverses stimulations lumineuses.

5.4.2. Réponse non photique.

5.4.2.1. Mélatonine.

Les récepteurs MT1 et MT2 sont présents dans les SCN. Chez la souris, la suppression des gènes de ces récepteurs a permis d'associer le récepteur **MT1 à la suppression de l'activité électrique des SCN** en réponse à l'application de mélatonine. Les récepteurs **MT2** seraient associés aux **décalages de phases** obtenus après l'application de la mélatonine (Liu *et al.*, 1997). La mélatonine appliquée à la transition jour/ nuit induit des avances de phase de l'activité électrique des SCN *in vitro* (Shibata *et al.*, 1989 ; Stehle *et al.*, 1989 ; McArthur *et al.*, 1991) mettant en évidence son rétrocontrôle sur l'horloge. Cependant, d'un point de vue moléculaire, son action sur les SCN n'est pas encore bien élucidée, car **l'application de**

mélatonine n'est suivie d'aucun effet sur les gènes horloge *Per*, *Cry*, *Bmal* ou *Clock* (Poirel *et al.*, 2003). Toutefois des résultats récents montrent **une avance de phase de *Rev-erba* dans les SCN** (Agez *et al.*, 2007).

5.4.2.2. Hyperactivité transitoire.

L'**activation comportementale** a également un effet sur les gènes horloges qui est totalement opposé à celui observé avec les facteurs photiques, c'est-à-dire qu'elle provoque une **diminution de la transcription de *Per1* et de *Per2* durant le jour subjectif** (Maywood *et al.*, 1999).

5.4.2.3. Nourriture.

Comme mentionné précédemment, les **changements de disponibilité alimentaire** sont capables de **synchroniser les tissus périphériques** de manière efficace (Damiola *et al.*, 2000). Il semblerait cependant que les SCN, si l'on excepte des observations isolées en conditions constantes ou des phénomènes souche spécifiques, soient assez **insensibles à la restriction temporelle**. Il a ainsi été démontré que la phase d'expression des gènes horloges n'est pas affectée par une restriction de l'accès à la nourriture limitée à la phase éclairée du nyctémère (Damiola *et al.*, 2000).

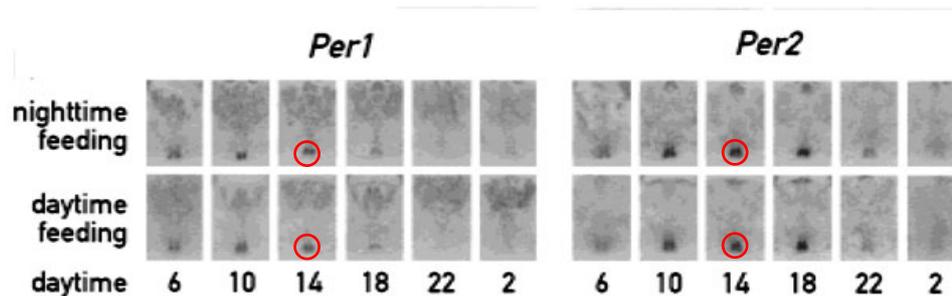


Figure 12 : Expression des gènes *Per1* et *Per2* dans les SCN de souris en réponse à une restriction temporelle de l'accès à la nourriture.

Les souris avaient un accès limité à la phase obscure (nighttime feeding) ou à la phase éclairée (daytime feeding) du nyctémère. Les heures indiquées en dessous de chaque image correspondent à l'heure de prélèvement. Les marquages ont été obtenus par hybridation *in situ* radioactive pour les ARN messagers de *Per1* (panneau de gauche) et de *Per2* (panneau de droite) sur des coupes coronales de cerveaux.

○ = SCN

(Adapté de Damiola *et al.*, 2000)

Par contre, comme suggéré par les modifications comportementales et physiologiques (sécrétion de mélatonine) observées lors d'une **restriction calorique**, les **SCN sont affectés** par ce type de restriction. Une analyse approfondie de l'expression des gènes horloges dans les SCN dans ces conditions démontre que **la phase de *Per1* et *Cry2* est avancée de 1 et 3 heures**. La restriction calorique affecte en outre les sorties des SCN puisqu'une **avance de phase de l'AVP de plus de 4 heures** est observée (Mendoza *et al.*, 2005c).

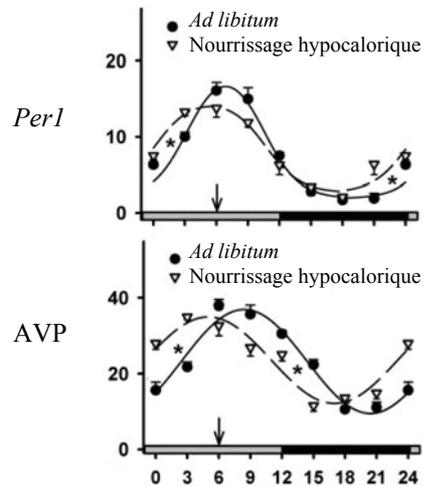


Figure 13 : Expression des gènes *Per1* et *AVP* dans les SCN de souris en réponse à un nourrissage hypocalorique.

Les souris avaient accès à 66% de nourriture par rapport à leur prise alimentaire normocalorique. Les heures indiquées en dessous de chaque image correspondent à l'heure de prélèvement exprimée en temps zeitgeber. Les marquages ont été obtenus par hybridation *in situ* radioactive pour les ARN messagers de *Per1* (panneau supérieur) et de l'*AVP* (panneau inférieur) sur des coupes coronales de cerveaux.

↓ = heure du nourrissage.

(Adapté de *Mendoza et al., 2005c*).

5.5. Activité électrique.

Les changements circadiens de la **fréquence de décharge électrique** des SCN sont l'une des caractéristiques les plus connues de l'horloge circadienne (*Inouye et Kawamura, 1979* ; *Green et Gillette, 1982* ; *Shibata et al., 1982*). **L'activité électrique la plus intense** est observée durant la **phase lumineuse** du nyctémère. En outre, un rythme d'activité électrique des neurones des SCN **persiste en DD** (*Nakamura et al., 2001*).

L'activité électrique est une caractéristique importante d'un tissu nerveux puisqu'il en résulte des libérations de neurotransmetteurs ou de neuropeptides. Les gènes horloges étant à l'origine des oscillations de l'horloge circadienne, il est important de voir quelles **relations** existent **entre l'expression de ces gènes et l'activité électrique des cellules des SCN**. La corrélation entre gènes horloge et activité électrique dans les SCN n'est pas encore clairement établie, toutefois quelques éléments expérimentaux tendent à la mettre en évidence : premièrement, en DD, des souris doubles mutantes pour *Cry1* et *Cry2* ne montrent de rythmicité circadienne ni dans la fréquence de décharge des SCN, ni du point de vue comportemental (*Albus et al., 2002*). D'autres expériences suggèrent qu'il existe une **corrélation entre l'expression de *Per1* et l'activité électrique dans les cellules des SCN** (*Quintero et al., 2003*). Il semblerait donc que l'activité électrique des SCN puisse être reliée à d'autres indicateurs connus : elle serait donc également une sortie de l'horloge.

5.6. Projections nerveuses.

Les connexions nerveuses efférentes aux SCN ont été établies en utilisant l'immunomarquage pour l'*AVP* et le *VIP*, combiné avec des techniques de lésion ou de traçage. Chez les

rongeurs, les **projections majoritaires** aboutissent dans la **zone subparaventriculaire** en dessous des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN). Une petite partie des projections se prolongent vers le **noyau paraventriculaire thalamique** (PVT) et les **noyaux dorsomédiaux** (DMH) et **ventromédiaux** (VMH) de l'hypothalamus. Des projections minoritaires peuvent être observées en direction du noyau préoptique médial (MPN), du noyau antéroventral, du septum latéral, et du noyau du lit de la strie terminale (BNST). Des projections intra SCN assurent la synchronisation de tous les neurones des SCN. Les projections vers la zone subparaventriculaire, les PVN, les DMH et l'aire préoptique médiale permettent la modulation de fonctions physiologiques, endocrines et autonomes comme la sécrétion d'hormones ou la température corporelle (Van Esseveldt *et al.*, 2000).

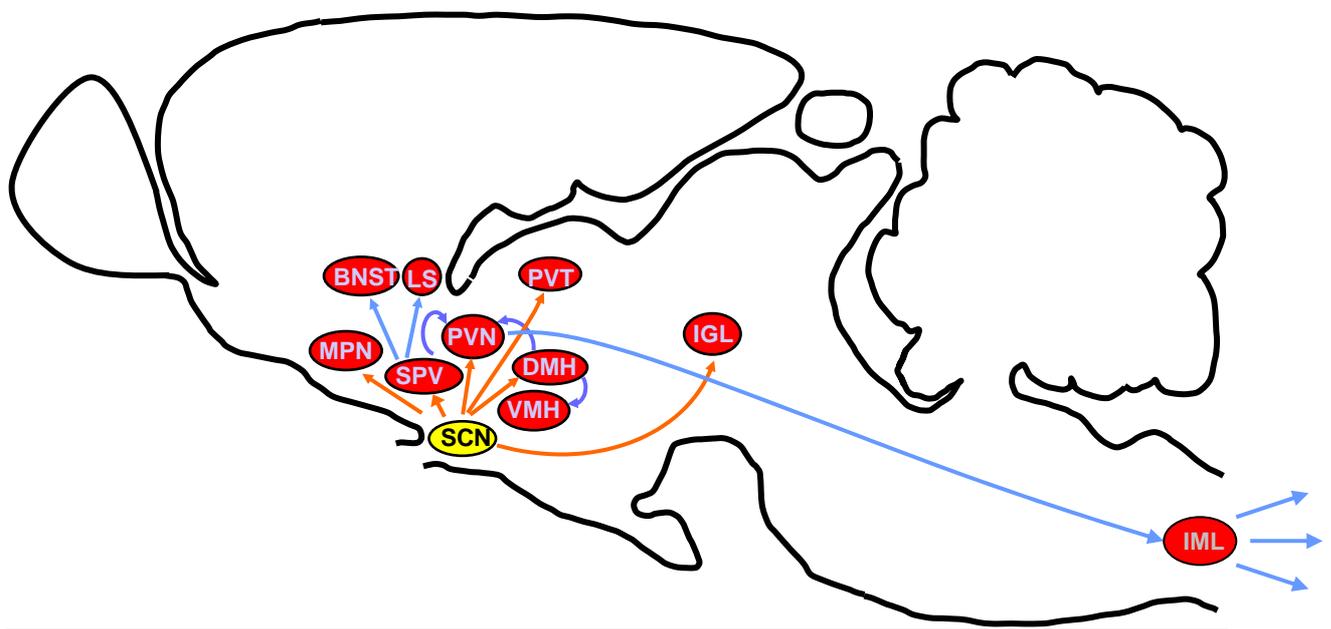


Figure 14 : Efférences des SCN.

Structures innervées par les SCN. *BNST* : noyau du lit de la strie terminale; *DMH* : noyau dorsomédial de l'hypothalamus; *IGL* : feuillet intergénéral latéral; *IML* : colonne intermédiale latérale de la moelle épinière; *MPN* : aire préoptique médiale; *PVN* : noyau paraventriculaire hypothalamique; *PVT* : noyau paraventriculaire thalamique; *LS* : septum latéral; *SCN* : noyau supra-chiasmatique; *SPV* : zone subparaventriculaire; *VMH* : noyau ventromédial de l'hypothalamus. Les flèches orange indiquent les projections directes depuis les SCN. Les flèches bleues indiquent quelques projections indirectes, dont celle des PVN vers l'IML, point d'entrée des messages empruntant les voies sympathiques.

(D'après Kalsbeek et Buijs, 2002)

5.7. Sorties physiologiques.

5.7.1. Mélatonine.

La **mélatonine** est une hormone **libérée par la glande pinéale** (ou épiphyse) uniquement pendant la **phase nocturne** du nyctémère (pour revue Simonneaux et Ribelayga, 2003). Diverses études, notamment de traçage, ont pu mettre en évidence la **voie polysynaptique** permettant le contrôle de cette glande endocrine par les SCN. Brièvement, les **PVN**, la **colonne intermédiale latérale** de la moelle épinière (IML) et les **ganglions cervicaux**

supérieurs, servent de relais successifs à l'information entre les SCN et la glande pinéale (Larsen, 1999 ; Teclerian-Mesbah *et al.*, 1999). Au sein de cette glande, l'enzyme limitante de la synthèse de mélatonine est l'**AA-NAT** (Aryl-alkylamine N-acétyl transférase). Le rythme de présence des ARNm de l'*aa-nat* comme celui de la libération de mélatonine, sont abolis par lésion de l'une des structures de la voie de contrôle, confirmant ainsi leur implication dans cette voie polysynaptique (Kalsbeek *et al.*, 2000 ; Garidou *et al.*, 2001 ; Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Les SCN, via leurs projections vers les PVN, permettent de **contrôler la libération de mélatonine** par un jeu d'activation (glutamate) et d'inhibition (GABA) de leurs neurones cibles situés dans les PVN (Perreau-Lenz *et al.*, 2004).

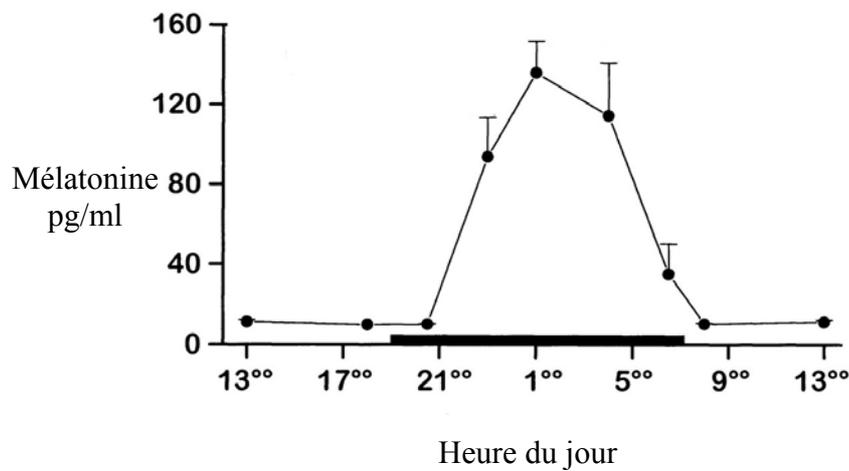


Figure 15 : Profil de sécrétion de mélatonine dans le plasma de rats en fonction de l'heure du jour (pg/ml).

Notez que la sécrétion de mélatonine s'effectue exclusivement la nuit, indiquée ici par une barre noire au-dessus de l'axe des abscisses.

(Adapté de Klante *et al.*, 1999)

5.7.2. Corticostérone.

Les neurones GABAergiques des SCN projettent sur les neurones des PVN et inhibent dynamiquement leur activité durant le jour. **Durant la nuit, cette inhibition est levée et les neurones autonomes des PVN sont alors actifs.** Ce phénomène est renforcé par une activation conjointe des PVN par les projections glutamatergiques des SCN (Perreau-Lenz *et al.*, 2004) Les SCN stimulent ainsi la libération **CRH** (Corticotropin-Releasing Hormone) par les neurones des **PVN**. Celle-ci est libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire ce qui induit la synthèse de l'hormone corticotrope **ACTH** (Adreno-CorticoTropin Hormone) par l'hypophyse antérieure, puis sa sécrétion dans la circulation générale. L'ACTH ainsi libérée stimule **la synthèse et la libération de glucocorticoïdes** par le cortex surrénalien. Selon les espèces, la stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien se traduit par la production principale de **corticostérone** (rat), de cortisol (Homme ou hamster syrien), ou d'un mélange des deux hormones (hamster sibérien). Outre le contrôle humoral de la sécrétion des glucocorticoïdes *via* l'ACTH, il existe en parallèle un **contrôle nerveux** de cette sécrétion par

le système sympathique, qui module la sensibilité de la glande surrénale à l'ACTH (Kalsbeek et Buijs, 2002).

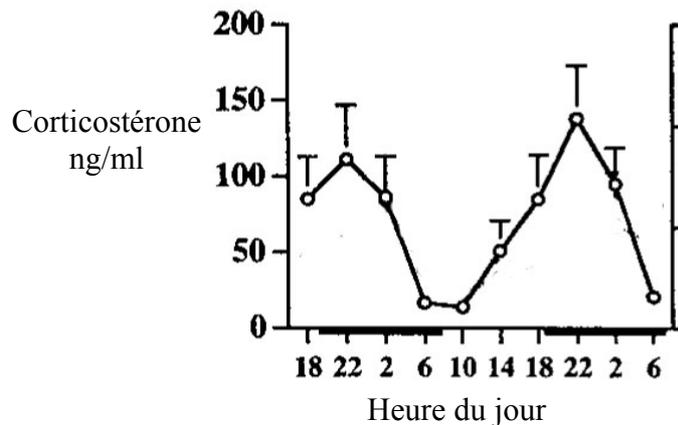


Figure 16 : Profil de sécrétion de corticostérone dans le plasma de rats en fonction de l'heure du jour. Noter que l'augmentation de la sécrétion de corticostérone s'effectue en anticipation de l'arrivée de la nuit (indiquée par des barres noires sur l'axe des abscisses). Cela prépare l'organisme au début de l'activité, nocturne chez le rat. Deux jours consécutifs de mesures ont été rapportés ici.

(Adapté de Sage *et al.*, 2001)

5.7.3. Glucose et autres métabolites plasmatiques.

De nombreuses enzymes du métabolisme, comme par exemple l'**insuline** et le **glucagon** respectivement **hypoglycémiant** et **hyperglycémiant**, présentent un **rythme de sécrétion** dans le plasma (LaFleur *et al.*, 1999 ; Kalsbeek *et al.*, 2006). Cependant, si l'on abolit artificiellement le rythme de prise alimentaire, ce rythme disparaît. Ces rythmes sont donc une **réponse passive à la prise alimentaire**.

Il n'en va pas de même pour le rythme de **glucose** dans le sang, qui persiste même dans le cas où la prise alimentaire ne présente pas de rythme circadien, chez des animaux SCN intacts. Ce rythme est donc à relier avec le **fonctionnement des SCN** (LaFleur *et al.*, 1999).

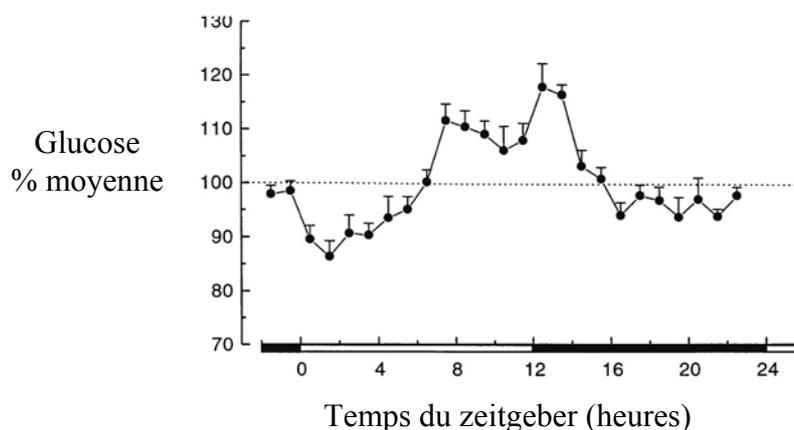


Figure 17 : Profil de glucose dans le plasma de rats en fonction de l'heure du jour.

La concentration de glucose dans le plasma est plus importante entre ZT8 et ZT14, c'est à dire juste avant le début de l'activité locomotrice. L'alternance du jour et de la nuit est reportée respectivement par des barres blanches et noires sur l'axe des abscisses.

(Adapté de LaFleur *et al.*, 1999)

Des rythmes plasmatiques journaliers sont également observables pour d'autres métabolites tels que les **triglycérides**, le **glucose** ou les **corps cétoniques** (Escobar *et al.*, 1998).

5.7.4. Température.

La **température corporelle** est contrôlée par deux variables, l'une **homéostatique** et l'autre **circadienne**. La régulation circadienne de la température est apparente lorsqu'elle est dissociée de la composante de l'activité locomotrice. Chez des rongeurs présentant des **lésions partielles des SCN**, l'activité locomotrice peut devenir arythmique sans que la température le soit (Satinoff et Prosser, 1988). Par contre, des **lésions complètes des SCN abolissent totalement les rythmes de température** (Eastman *et al.*, 1984). Cependant, les lésions des SCN **n'abolissent pas la réponse thermorégulatrice** (Wachulec *et al.*, 1997) sous contrôle des systèmes sympathique et parasympathique. Il est probable que les SCN contrôlent partiellement ces phénomènes via des projections vers les noyaux préoptiques médians (des lésions de ces noyaux abolissent une partie des réflexes de thermorégulation ; Osborne et Refinetti, 1995).

5.8. Sorties comportementales.

Activité locomotrice, prise alimentaire et prise hydrique sont les rythmes les plus étudiés en tant que marqueurs de la phase des SCN. Ils **demeurent rythmiques** pourvu que les SCN soient **intacts** (Rosenwasser *et al.*, 1981 ; Clarke et Coleman, 1986). Ils sont concomitants en conditions normales, mais peuvent être dissociés par des protocoles de restriction (Mistlberger, 1994).

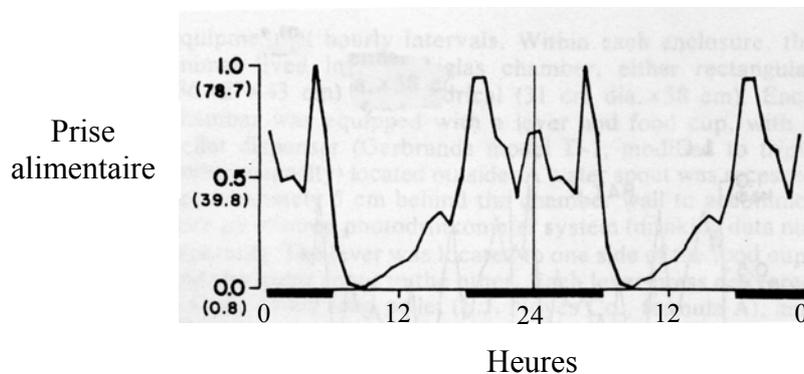


Figure 18 : Rythme de prise alimentaire chez le rat en LD.

La prise alimentaire est représentée en ordonnée comme étant la prise par heure. La valeur 1.0 correspond à la prise horaire maximale en nombre de croquettes (78.7 par heure) et la valeur 0.0 à la valeur minimale de prise alimentaire horaire (0.8 par heure). Notez que la prise alimentaire survient majoritairement la nuit.

(Adapté de Rosenwasser *et al.*, 1981).

Nous voilà donc revenus à notre point de départ : au bout de la chaîne des rythmes circadiens se trouvent les éléments qui ont permis l'identification de l'horloge circadienne principale : les sorties comportementales de l'horloge.

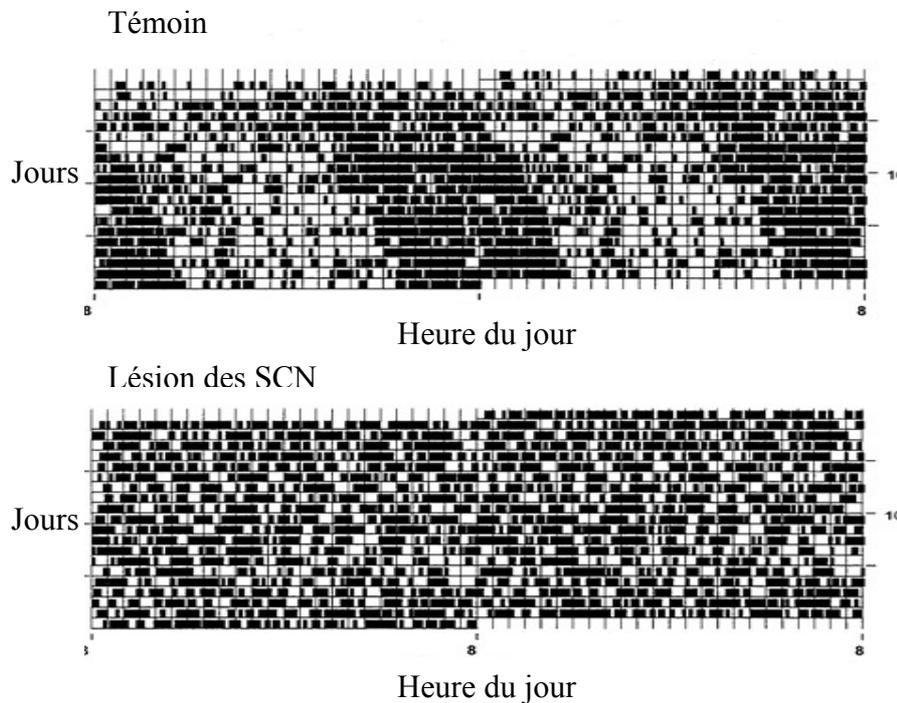


Figure 19 : Expérience de lésion : l'ablation d'une structure hypothalamique abolit les rythmes d'activité locomotrice.

Actogrammes d'un rat placé en obscurité constante. Les périodes d'activité sont représentées par des barres noires. Les actogrammes sont en double représentation, c'est à dire que le 2^e jour est représenté à la fois sur la première ligne et la seconde ligne. Après lésion, l'activité locomotrice ne présente plus de rythmicité circadienne.

(Adapté de Stephan et Zucker, 1972)

Les **SCN** sont donc capables de **recevoir**, **d'intégrer**, de **générer** et de **distribuer** un message à caractère **circadien**. Ils remplissent donc toutes les conditions nécessaires à la dénomination d'horloge. **Les SCN sont l'horloge circadienne principale**. Cependant, un nombre croissant d'études dans le domaine indique que les SCN n'auraient pas l'exclusivité de l'appellation d'horloge.

III. D'autres horloges circadiennes ?

Depuis 1997, plusieurs groupes ont démontré l'expression de gènes horloges dans la plupart des structures cérébrales hors SCN, tissus périphériques, et même cellules isolées chez les Mammifères (Damiola *et al.*, 2000 ; Yamazaki *et al.*, 2000 ; Reppert et Weaver, 2002 ; Matsui *et al.*, 2005). Ces tissus ou organes oscillants ont été nommés horloges périphériques. Ce titre est-il usurpé ?

1. Horloges cellulaires.

1.1. Elaboration du message : expression des gènes horloges dans toutes les cellules.

Dans les SCN, la génération des oscillations circadiennes trouve son origine dans les **oscillations moléculaires** au sein non seulement d'une cellule unique, mais aussi à l'échelle du noyau entier. Les études portant sur les oscillations de l'**expression des gènes horloges dans les cellules périphériques** ont largement utilisé le modèle des **fibroblastes** en culture. Elles confirment que l'oscillation, les relations de phase et le délai ARNm / protéine sont conservés dans les fibroblastes pour l'ensemble des gènes horloges connus (Yagita *et al.*, 2001). Cependant ces oscillations, à la différence des SCN semblent **disparaître après quelques cycles**. Cet amortissement ne résulte pas d'une perte de rythmicité mais de la **désynchronisation des cellules entre elles** (Nagoshi *et al.*, 2004 ; Welsh *et al.*, 2004). Dans les SCN, les cellules rythmiques sont couplées entre elles, assurant ainsi une oscillation homogène de la structure entière (Maywood *et al.*, 2006). Les fibroblastes en culture n'étant pas couplés, chacun oscille indépendamment des autres, chacun avec sa période propre, néanmoins **auto-entretenu**, ce qui entraîne un aplatissement du rythme lorsque l'on considère la culture entière.

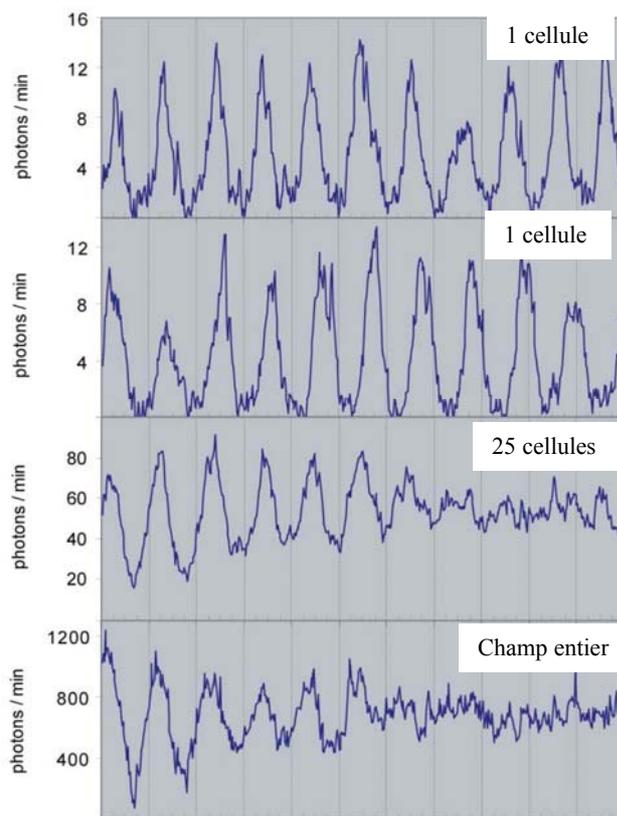


Figure 20 : Désynchronisation de fibroblaste de rat en culture.

Un gène rapporteur (luciférase) sous contrôle du même promoteur que *Per2* permet de suivre l'expression de ce gène. Une caméra photosensible permet l'enregistrement d'une cellule seule ou d'un ensemble de cellules. Chaque cellule individuelle oscille durant plus de 11 jours (2 premiers panneaux, en haut). Si l'on observe 25 cellules en même temps, en 6 jours, les oscillations sont amorties. Ce phénomène est encore plus évident sur le champ entier (dernière courbe, en bas).

(Adapté de Welsh et al, 2004)

Chaque cellule est donc capable d'élaborer un message rythmique de manière endogène.

1.2. Réception / intégration.

Afin d'établir que chaque cellule d'un mammifère est capable de recevoir et d'intégrer un message à caractère rythmique, il faudra que le stimulus **modifie la phase d'expression des gènes horloges** de cette cellule : S'il a été clairement démontré que des fibroblastes en culture sont capables d'osciller de manière individuelle, il n'est pas certain que les **fibroblastes** puissent **recevoir et intégrer** des messages. Sans cela, les fibroblastes seront relégués au statut de « **pacemakers** », entités oscillantes isolées des signaux environnementaux. Ce n'est bien entendu pas le cas puisqu'il a été démontré qu'un **choc au sérum** administré à des fibroblastes en culture peut « déclencher » l'oscillation des **gènes horloges** de manière **synchrone** pour toutes les cellules de la culture (Balsalobre *et al.*, 1998). En fait, ce signal resynchronise l'expression des gènes horloges dans tous les fibroblastes qui oscillent de nouveau en phase. L'utilisation de forskoline, un activateur de la voie de signalisation de **l'AMP cyclique** a permis d'affiner ces résultats en démontrant que la synchronisation des fibroblastes peut s'opérer par cette voie (Yagita et Okamura, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus avec une stimulation par un agoniste des récepteurs aux **glucocorticoïdes** : la dexaméthasone. Le récepteur aux glucocorticoïdes est essentiel à ce phénomène, ce qui indique que la corticostérone et/ou ses métabolites seraient impliqués dans la signalisation temporelle *in vivo* (Balsalobre *et al.*, 2000). Néanmoins il n'a pas encore été démontré que ces synchroniseurs devaient être présentés dans des gammes de fréquences circadiennes pour pouvoir synchroniser ces fibroblastes à long terme. La question reste donc ouverte.

1.3. Distribution du message.

Là où la condition d'horloges cellulaires devient plus difficile à établir, c'est dans la distribution du message. Il n'a en effet jamais pu être démontré que l'expression rythmique des gènes horloges dans les cellules individuelles avait une répercussion sur les « sorties » éventuelles de celles-ci. Mais l'intérêt de la génération de rythmes *in situ* ne doit pas forcément être recherché dans une sécrétion humorale. Il est possible et même probable que **la présence d'une horloge individuelle** dans chaque cellule a **un intérêt dans le timing de fonctions cellulaires** comme la mitose. Des conditions environnementales ou génétiques qui atteignent la coordination du système circadien peuvent accélérer la progression de tumeurs (Van Den Heiligenberg *et al.*, 1999 ; Filipski *et al.*, 2002 ; Filipski *et al.*, 2004, Filipski *et al.*, 2005). Sachant que le système circadien a un effet de régulation négative rythmique sur le cycle cellulaire, il est plus facile de comprendre pourquoi des souris mutantes pour le gène *Per2* sont plus enclines à développer des tumeurs en réponse à une irradiation aux rayons gamma, par rapport à des souris sauvages (Fu *et al.*, 2002). Egalement, suite à une ablation partielle des lobes du foie, des **divisions synchrones** des hépatocytes assurent une **régénération rapide des tissus**. Cette régénération est **ralentie chez des souris mutantes pour les gènes *Cry1* et *Cry2***, même si elle est encore possible (Matsuo *et al.*, 2003). Il est donc probable qu'une **horloge cellulaire individuelle distribue un message à caractère**

rythmique au niveau local, ce qui permet de conserver **l'intégrité cellulaire** à plus long terme. Ces systèmes d'horloges cellulaires, seraient néanmoins synchronisés par un chef d'orchestre : les SCN. La **dominance des SCN** sur les oscillateurs périphériques a été formellement démontrée par Pando et collaborateurs (2002) qui ont greffé des SCN de souris *Per1*^{-/-}, présentant une période endogène courte, chez des souris sauvages ayant subi au préalable une lésion des SCN. Ils ont constaté que la période d'oscillation des fibroblastes était alors entraînée à une période proche de celle des SCN greffés (Pando *et al.*, 2002).

2. Horloges tissulaires périphériques ?

2.1. Foie, rein, poumon.

Outre les cellules isolées, bon nombre de **tissus périphériques** présentent des **oscillations auto-entretenues des gènes horloges**. Ces oscillations ont longtemps été considérées comme non persistantes (6-7 cycles) suite à des études réalisées chez des rats *Per1*-Luciférase (le gène de la luciférase étant placé sous contrôle du promoteur de *Per1*) sur des explants de tissus en culture (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Yamazaki *et al.*, 2002). Une fois encore, **l'absence de couplage entre cellules** semble responsable de la disparition du rythme à l'échelle du tissu. Cependant une étude récente utilisant des souris *PER2*-Luciférase (protéine de fusion) démontre une **persistance des oscillations de PER2** au delà de **20 cycles** dans un certain nombre d'explants de tissus : foie, rein, poumon, cornée, hypophyse (Yoo *et al.*, 2005).

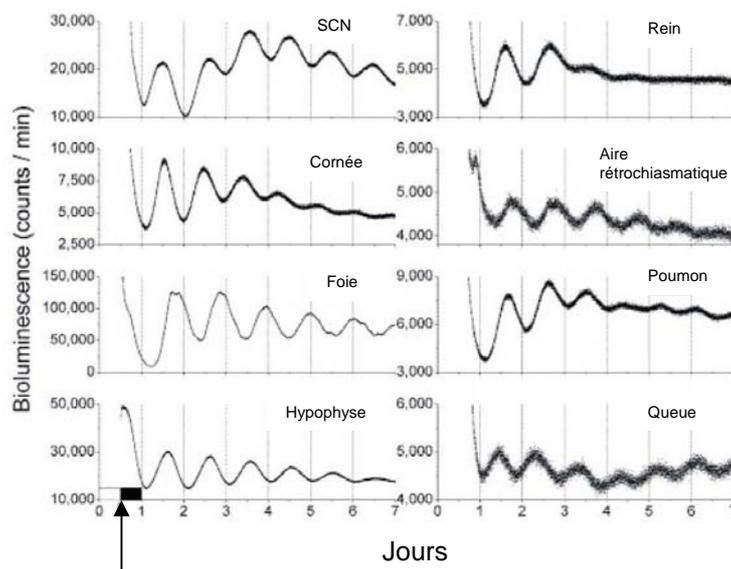


Figure 21 : Enregistrements en temps réel de la bioluminescence émise par divers tissus de souris mutantes *PER2*-Luciférase. Les tissus ont été prélevés juste après extinction des lumières, comme indiqué par la flèche en bas à gauche. La bioluminescence est exprimée en coups par minute. Il est à noter que la quasi totalité des tissus exprime une rythmicité circadienne à une période propre, durant plusieurs jours.

(Adapté de Yoo *et al.*, 2005)

Ces **oscillations persistent** dans des explants de tissus prélevés chez des animaux rendus arythmiques par une **lésion des SCN**. Cependant chaque tissu oscille avec une **période endogène propre**, ce qui entraînerait une **désynchronisation**, au sein d'un organisme, **entre les différents tissus périphériques**. Le rôle dominant des SCN qui donnent un signal quotidien de **remise à l'heure** à tous les tissus n'est donc pas remis en cause par ces études, même si elles n'excluent pas la possibilité que ces tissus soient eux-mêmes des horloges. Ces horloges pourraient recevoir un signal transmis par les SCN. A ce titre, il est fort probable que l'un des **signaux synchroniseurs** reconnus par l'ensemble des tissus périphériques soit les **glucocorticoïdes** : en effet, Balsalobre et collaborateurs (2000) ont montré qu'une injection de dexaméthasone, synchronisait non seulement des fibroblastes en culture, mais également les tissus périphériques *in vivo*, sans affecter la phase des SCN (Balsalobre *et al.*, 2000). Cette action s'effectue via les récepteurs aux glucocorticoïdes. Il semblerait qu'outre les glucocorticoïdes, nombre de **facteurs métaboliques** puissent synchroniser les tissus périphériques puisqu'un **changement dans la disponibilité alimentaire synchronise les tissus périphériques**, mais pas les SCN (Damiola *et al.*, 2000 ; Hara *et al.*, 2001 ; Stokkan *et al.*, 2001). Une fois encore, même s'il a été démontré que les tissus périphériques peuvent recevoir, intégrer et générer des messages à caractère circadien, aucune sortie n'a pu être mesurée jusqu'ici. Tous les tissus périphériques précédemment cités gardent donc un statut d'oscillateurs jusqu'à ce que le contraire soit prouvé.

2.2. Glandes surrénales.

Des souris ***Per1-Luciférase*** ont été utilisées afin de rechercher dans quels tissus périphériques une **stimulation lumineuse** (en DD) entraînait une **activation des gènes horloges**. La **glande surrénale**, responsable de la production de la corticostérone, a été observée comme répondant fortement à cette stimulation (Ishida *et al.*, 2005). La réponse de la glande surrénale est évidente non seulement au niveau des **gènes horloges**, mais également dans la **sécrétion de corticostérone**, qui augmente dans l'heure suivant l'exposition à la lumière. Cette réaction ne dépend pas de l'axe hypothalamo-hypophysaire puisqu'il n'y a pas d'augmentation de la quantité d'ACTH. Par contre, elle **dépend d'un contrôle des SCN** via le système nerveux sympathique puisqu'une lésion des SCN ou une dénervation sympathique abolissent cet effet (Ishida *et al.*, 2005). Les glandes surrénales peuvent donc recevoir et intégrer rapidement des informations lumineuses.

Plus récemment, il a été démontré que les **glandes surrénales expriment de manière rythmique les gènes horloges** traditionnels, aussi bien en LD qu'en DD (Oster *et al.*, 2006). Ces oscillations des gènes horloges sont à l'origine de **fluctuations dans la sensibilité de la glande surrénale à l'ACTH** (Oster *et al.*, 2006) et pourraient également expliquer les différences dans la sécrétion de corticostérone après exposition à une stimulation lumineuse à différents temps circadiens (Ishida *et al.*, 2005).

Des souris mutantes *Per2/Cry1* sont arythmiques en DD. La **sécrétion de corticostérone est également arythmique** chez ces souris. Cependant, la **transplantation** d'une glande surrénale de souris sauvage dans une souris mutante *Per2/Cry1* permet de **restaurer une rythmicité** dans la libération de corticostérone, mais ni dans l'activité locomotrice, ni dans la sécrétion d'ACTH. Cette observation, effectuée en LD, n'est cependant pas valide en DD, indiquant que **des SCN fonctionnels ne sont pas requis pour les oscillations des glandes surrénales en LD**, mais que les glandes surrénales ne sont pas capables d'osciller de manière autonome en DD (Oster *et al.*, 2006). Les glandes surrénales seraient donc bien influencées « directement » par les informations lumineuses.

L'ensemble de ces résultats démontre que les glandes surrénales abritent un **oscillateur périphérique**, qui joue un rôle local important dans **la régulation de la fonction surrénalienne**. La glande surrénale est capable de recevoir, d'intégrer et de distribuer des informations à caractère rythmique à l'ensemble de l'organisme (corticostérone), mais n'est pas capable d'oscillations auto-entretenuës. Encore une fois, l'une des conditions n'est pas remplie pour pouvoir parler d'horloge périphérique.

2.3. Rétine.

La rétine est la première horloge tissulaire hors SCN à avoir été identifiée. A ce titre, elle remplit l'ensemble des conditions requises à la condition d'horloge.

2.3.1. Réception et distribution d'un message

Les photorécepteurs rétiniens (cônes et bâtonnets) absorbent la lumière et la convertissent en **signal photique** qui sera transmis au cerveau, et en particulier aux SCN, *via* le RHT, à partir des cellules ganglionnaires (Meijer, 2001 pour revue). En absence de cônes et de bâtonnets fonctionnels, la réception des informations lumineuses circadiennes non visuelles peut encore être effectuée par les **cellules ganglionnaires**, grâce à un pigment photosensible : la **mélanopsine** (Provencio *et al.*, 1998 ; Panda *et al.*, 2002 ; Ruby *et al.*, 2002 ; Semo *et al.*, 2003).

Notons qu'une activité circadienne a été détectée dans la rétine des rongeurs, ce qui est démontré par la **libération rythmique de mélatonine** par des rétines en culture (Tosini et Menaker, 1996).

2.3.2. Elaboration d'un message rythmique.

En plus de ces rythmes endogènes de libération de mélatonine, une expression rythmique des **gènes horloges** classiques (*Per*, *Cry*, *Bmal1*) a été décrite dans plusieurs types cellulaires de la rétine, même si ces rythmes ne sont pas toujours robustes (Kamphuis *et al.*, 2005 ; Ruan *et al.*, 2006). En outre, des études utilisant des gènes rapporteurs associés au gène *Per1* indiquent que ce gène est exprimé de manière rythmique dans les cellules ganglionnaires de la rétine (Witkovsky *et al.*, 2003).

3. Horloges tissulaires centrales.

3.1. Horloges ou oscillateurs esclaves des SCN ?

L'expression des **gènes horloges** a été observée dans la **quasi totalité des tissus cérébraux** testés (Asai *et al.*, 2001; Wakamatsu *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2002 ; Granados-Fuentes *et al.*, 2004 ; Matsui *et al.*, 2005). De là à vouloir les considérer comme des horloges, il n'y a qu'un pas. Cependant plusieurs études démontrent qu'il n'en est rien, puisqu'**une lésion des SCN abolit la rythmicité dans un grand nombre de structures cérébrales**. Par exemple la protéine PER2 présente un rythme d'expression dans le noyau ovale du lit de la strie terminale (BNST), les noyaux central et basal de l'amygdale et le gyrus denté de l'hippocampe. Ce rythme est aboli chez des animaux SCN lésés indiquant le rôle central des SCN dans la genèse de ces oscillations. Notons par ailleurs qu'une **ablation des glandes surrénales** abolit de la même façon le rythme de PER2 dans le BNST et l'amygdale centrale (Amir *et al.*, 2004 ; Lamont *et al.*, 2005 ; Segall *et al.*, 2006) ce qui indique, tout comme pour les tissus et les cellules périphériques, que les **glucocorticoïdes sont très importants pour la distribution du message circadien** par les SCN. Ces derniers gardent donc leur place d'horloge principale, de nombreuses autres structures leur restant subordonnées.

Cependant il ne faut pas négliger **l'importance de la disponibilité alimentaire** dans la phase et le rythme d'expression des gènes horloges dans de nombreux tissus cérébraux. En effet, une restriction temporelle de l'accès à la nourriture (Restricted Feeding : RF), **modifie le rythme d'expression de *Per1* et *Per2* dans la plupart des structures observées** (Wakamatsu *et al.*, 2001; Angeles-Castellanos *et al.*, 2007). Il en est de même pour la protéine PER2 dont les niveaux sont altérés dans l'amygdale en réponse à une RF (Lamont *et al.*, 2005 ; Waddington-Lamont *et al.*, 2007).

3.2. Les bulbes olfactifs.

Ce constat très général d'oscillateurs centraux asservis aux SCN, n'est cependant pas absolu : **les bulbes olfactifs présentent un rythme endogène d'expression de *Per1***, y compris chez des animaux arythmiques du point de vue comportemental (Granados-Fuentes *et al.*, 2004). En outre, les **cellules** des bulbes olfactifs **se synchronisent entre elles**, comme démontré par leurs rythmes de fréquences de décharges neuronales (Granados-Fuentes *et al.*, 2004). Plus récemment, un **rythme d'induction de c-FOS**, marqueur d'activation neuronale, a été détecté en réponse à la présentation d'odeurs : Le nombre de cellules répondant au stimulus est plus important en début de nuit. Ce rythme **persiste en conditions constantes** ainsi que **chez des animaux SCN lésés**, excluant un contrôle de cette caractéristique par les SCN. De plus, une lésion des bulbes olfactifs abolit le rythme d'expression de c-FOS en réponse aux odeurs dans le cortex piriforme (cortex olfactif primaire). Les **bulbes olfactifs** sont donc capables de **recevoir** des informations olfactives auxquelles ils **réagissent** de manière différentielle au cours du nyctémère. Ils **distribuent** ce message rythmique au cortex piriforme pour en

contrôler le rythme d'expression de c-FOS (Granados-Fuentes *et al.*, 2006). Les bulbes olfactifs peuvent recevoir et intégrer un message, générer et distribuer un message rythmique. Cependant, il n'a pas encore été démontré que la présentation d'un stimulus environnemental devait être dans le **domaine circadien** pour pouvoir entraîner les rythmes dans ce tissu. Mise à part cette légère objection qui reste à éclaircir, il semblerait que les **bulbes olfactifs puissent effectivement obtenir le titre d'horloge centrale**.

Il est donc possible de trouver d'autres horloges tissulaires centrales, en dehors des SCN. Les bulbes olfactifs, responsables des réactions circadiennes aux odeurs, sont l'une d'elles. Une autre horloge putative a retenu l'attention ces 25 dernières années.

IV. Une autre horloge putative : l'horloge alimentaire.

1. Historique.

Des observations empiriques réalisées dans les années 1920-1930 sur des abeilles ouvrent de nouvelles perspectives pour la physiologie circadienne : Beling et Wahl constatent que les abeilles de leur jardin semblent avoir appris quand le petit déjeuner était servi dans le patio et se préparaient à ce repas. Il a en outre été démontré dans des études ultérieures que les abeilles étaient capables d'anticiper un accès quotidien à de l'eau sucrée, à la fois sur le plan individuel et au niveau de la colonie, et ce si l'eau sucrée est disponible à une fréquence proche de 24 heures (pour revue voir Mistlberger 1994). Sachant que **l'anticipation d'évènements récurrents ayant une période proche de 24 heures** est l'apanage des horloges circadiennes, il n'y a qu'un pas qui nous sépare d'une **horloge synchronisée par la nourriture**. Cependant, des études extensives n'ont pas été réalisées chez l'abeille, mais chez des Rongeurs. Notons cependant que des phénomènes similaires ont été rapportés chez diverses espèces de Poissons, Oiseaux et Mammifères, Primates y compris mais qu'il ne sera fait référence qu'aux rongeurs dans ce qui va suivre.

2. Mise en évidence.

2.1. Rat et souris.

Si des comportements d'anticipation de la nourriture ont été observés dès les années 1920, rien n'indiquait qu'ils n'émanaient pas de l'horloge principale. En 1979, F. K. Stephan et collaborateurs établissent que chez des rats présentant des lésions bilatérales des SCN (c'est à dire arythmiques), il est possible de **restaurer un rythme journalier d'activité**, si les animaux sont soumis à un accès **contrôlé à la nourriture**. Après quelques jours, les animaux deviennent actifs dans les heures qui précèdent l'arrivée de la nourriture, celle-ci étant présentée tous les jours à la même heure. Cette **activité anticipatoire de la nourriture** (Food anticipatory activity : FAA) est caractéristique des rythmes de synchronisation alimentaire. Elle est considérée comme une sortie d'un **oscillateur situé à l'extérieur des SCN**, puisque

son expression persiste après lésion de cette structure. Notons que ce phénomène est également observable chez la souris (Marchant et Mistlberger, 1997).

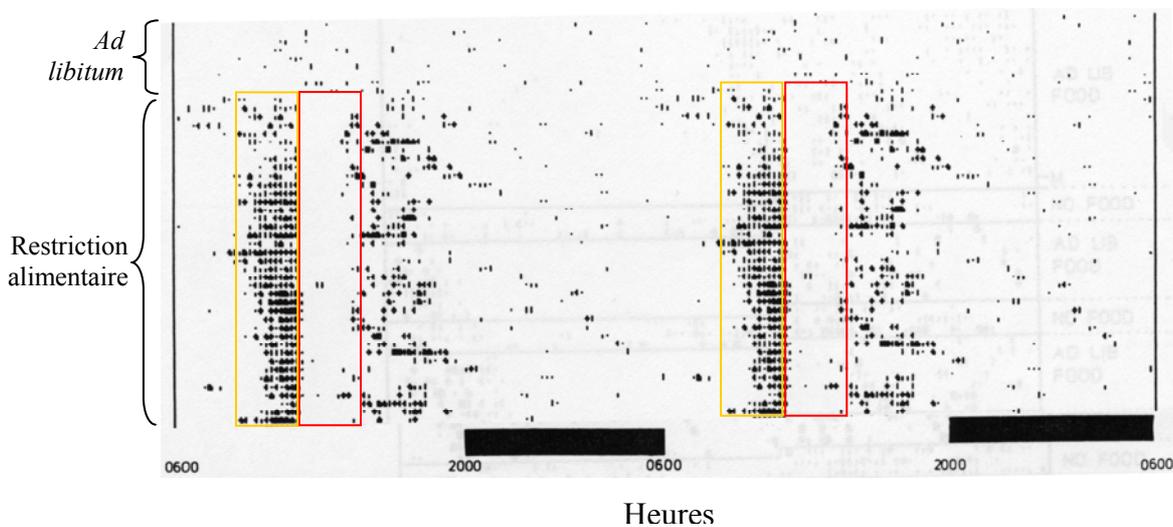


Figure 22 : Une restriction temporelle de l'accès à la nourriture restaure un rythme journalier d'activité locomotrice chez des animaux arythmiques.

Actogramme en double représentation d'un rat ayant subi des lésions des SCN. Il est arythmique en condition *ad libitum*. Une restriction alimentaire restaure en quelques jours un rythme journalier d'activité locomotrice, qui s'exprime sous forme d'une FAA (rectangles jaunes). L'accès à la nourriture est représenté par les rectangles rouges. Le cycle LD est reporté en abscisse, les barres noires représentant la nuit.

(Adapté de Clarke et Coleman, 1986)

Il semble donc que l'existence d'un oscillateur extérieur à l'horloge principale, ou au moins les mécanismes de **synchronisation alimentaire** soient observables chez les Rongeurs.

Mais est-il possible que ce que l'on a longtemps considéré comme un oscillateur possède, au même titre que les SCN, des propriétés d'horloge ? Pour le démontrer, il nous faudra établir que cet oscillateur est capable de **recevoir** un message dans le domaine circadien, d'**intégrer** ce message, puis d'**élaborer** un signal circadien qu'il **distribuera** à un ensemble de sorties mesurables, et enfin que les oscillations transmises soient **auto-entretenues**. Nous aurons alors non pas un oscillateur alimentaire, mais une **horloge alimentaire**. D'ici là, cette horloge putative sera désignée par le sigle **FEO** pour **Food Entrainable Oscillator** ou oscillateur entraînable par la nourriture.

3. Distribution d'un message circadien : sorties.

Nous commençons ici par la fin, afin de nous permettre de poser les bases de cette horloge putative. Il est évident que si nous voulons mesurer la réception potentielle d'un message et son intégration, nous devons avoir accès à des sorties de l'horloge considérée. Sont donc présentées dans cette section les sorties pouvant être influencées par une restriction alimentaire, ou d'autres facteurs environnementaux comme rapporté en section IV-4.

3.1. Activité locomotrice (FAA)

L'activité locomotrice est le premier paramètre pour lequel il a été démontré que la nourriture pouvait restaurer un rythme en absence des SCN (Stephan *et al.*, 1979). La **FAA** est évidente après quelques jours de restriction alimentaire. Elle peut être observée à la fois dans **l'activité de roue** (Stephan *et al.*, 1979) et dans **l'activité générale** (Mistlberger et Rechtschaffen, 1984). Dans ce cas, soit un transmetteur est implanté dans la cavité abdominale de l'animal et un dispositif externe enregistre les déplacements de l'animal par unité de temps, soit l'activité est évaluée grâce à des détecteurs infrarouges mesurant les déplacements de l'animal. La FAA peut être observée chez des **animaux SCN lésés** mais aussi chez des **animaux intacts** (Mistlberger, 1994 ; voir également section II.3.4.4). Dans ce cas elle s'exprime aussi bien si la nourriture est distribuée de jour que de nuit, bien que la plupart du temps l'accès à la nourriture soit de jour, afin d'éviter les interférences avec l'activité nocturne (Mistlberger, 1994). Après un retour des conditions de nourrissage *ad libitum*, la **FAA persiste durant quelques jours** (Honma *et al.*, 1983 ; Stephan, 1983) mais décroît et finit par disparaître (Stephan *et al.*, 1979 ; Coleman *et al.*, 1982). Ce résultat peut laisser penser que la FAA serait la **sortie d'un oscillateur qui s'amortit** au fil du temps ou qu'elle est la conséquence d'un « effet mémoire » du système, dont l'extinction peut durer plusieurs jours. Par contre ce phénomène de persistance en conditions *ad libitum* **exclut** que la FAA soit sous contrôle d'un **système « sablier »**. Si c'était le cas, la FAA cesserait d'emblée au passage en conditions *ad libitum* puisque l'absence de l'indicateur « heure du repas » entraînerait la fin du « retournement du sablier ». Le centre de contrôle de la FAA est donc probablement un oscillateur. Cependant, à ce stade nous ne pouvons pas exclure que la mémoire joue un rôle dans l'expression de la FAA.

3.1.1. Expérience de jeûne.

Même si la FAA disparaît progressivement en conditions *ad libitum*, lorsque les animaux sont **soumis à une période de jeûne**, la **FAA réapparaît à la même heure** que précédemment, et ce même après 50 jours en conditions *ad libitum* (Stephan *et al.*, 1979 ; Boulos *et al.*, 1980 ; Coleman *et al.*, 1982 ; Clarke et Coleman, 1986 ; Ruis *et al.*, 1989). Par contre, lors de **jeûnes répétés** séparés par des périodes de nourrissage *ad libitum*, **la réapparition de la FAA a tendance à diminuer** (Rosenwasser *et al.*, 1984 ; Ottenweller *et al.*, 1990), même si toutes les études ne semblent pas aller dans ce sens (Ruis *et al.*, 1989). De plus, des périodes successives de jeûne voient parfois une activité comparable à la FAA réapparaître à une heure différente du nyctémère, et se décaler au fil des jeûnes successifs (Ruis *et al.*, 1989). Ces décalages successifs peuvent être interprétés comme un **libre cours de la FAA** qui reflèterait la **période endogène du FEO**. Ces résultats indiquent la probable implication d'un **oscillateur**, sinon d'une horloge dans le contrôle de l'expression de la FAA puisque celle-ci réapparaît avec une précision difficilement explicable sans un système de mesure du temps, et reposant uniquement sur la mémoire. Le fait que la réapparition de la FAA se dissipe avec le

temps, peut signifier deux choses : soit le FEO est **découplé** de ses effecteurs par une longue période sans indications temporelles de la disponibilité alimentaire, soit le FEO est effectivement un **oscillateur** et n'est donc pas capable de produire des rythmes endogènes. Il faut cependant garder à l'esprit que les SCN, dans des conditions de lumière constante, peuvent devenir arythmiques, ainsi que leurs sorties, et ils sont pourtant indiscutablement une horloge. Il n'est donc pas impossible que la condition *ad libitum* soit délétère pour la rythmicité de la FEO. Cette question reste ouverte.

3.2. Boisson

Parmi les premières études réalisées sur la restauration de rythmes comportementaux suite à une restriction alimentaire, il a été démontré que le **rythme de prise hydrique** était similaire au rythme d'activité locomotrice, les animaux augmentant leur prise hydrique dans les heures précédant l'accès à la nourriture (Boulos *et al.*, 1980 ; Clarke et Coleman, 1986). La mesure de la prise hydrique s'effectue par le nombre de contacts de l'animal avec la pipette du biberon, qui sont comptés par un logiciel.

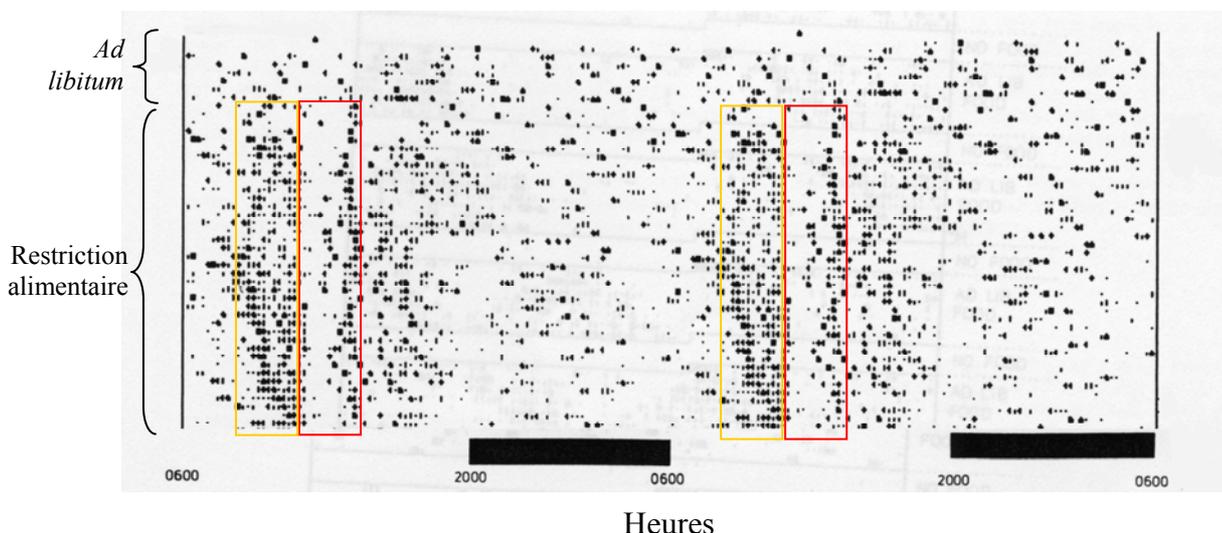


Figure 23 : Une restriction temporelle de l'accès à la nourriture restaure un rythme journalier de boisson chez des animaux arythmiques.

Actogramme en double représentation d'un rat ayant subi des lésions des SCN. Il est arythmique en condition *ad libitum*. Une restriction alimentaire restaure en quelques jours un rythme journalier de prise hydrique, qui s'exprime en anticipation de la nourriture (rectangles jaunes). Elle est mesurée par un nombre de contacts avec la pipette du biberon. L'accès à la nourriture est représenté par les rectangles rouges. Le cycle LD est reporté en abscisse, les barres noires représentant la nuit.

(Adapté de Clarke et Coleman, 1986)

3.3. Autres sorties comportementales.

En plus de l'activité locomotrice, des paramètres comportementaux peuvent attester de l'anticipation et de la synchronisation à un repas unique. **L'appui non renforcé sur un levier** et le **comportement d'approche de la mangeoire** sont des comportements couramment mesurés donnant des profils similaires à ceux obtenus avec l'activité locomotrice et l'eau de boisson. Dans le premier cas, l'animal a accès à un levier, en général proche de la mangeoire, sur lequel il peut appuyer pour recevoir de la nourriture. La nourriture ne lui est fournie que

dans la période d'accès habituelle. On constate que plus on se rapproche de l'heure d'accès à la nourriture, plus le nombre de pressions sur le levier augmente (Boulos *et al.*, 1980 ; Mistlberger, 1994). Dans le deuxième cas, le nombre de passages devant un faisceau infrarouge situé à l'entrée de la mangeoire est comptabilisé par un système d'acquisition.

3.4. Température (FAT)

De la même manière que l'activité augmente dans les heures qui précèdent l'accès à la nourriture, une **thermogenèse anticipant l'arrivée de la nourriture** (Food anticipatory thermogenesis ; FAT) survient en même temps que la FAA (Challet *et al.*, 1996a ; Recabarren *et al.*, 2005). Elle est visible aussi bien chez des animaux intacts que SCN lésés. De plus, elle n'est pas dépendante de l'heure d'accès à la nourriture (Nelson *et al.*, 1975). En plus de la FAT, le nourrissage est suivi par une **thermogenèse induite par la prise alimentaire** (Diet-induced thermogenesis : DIT).

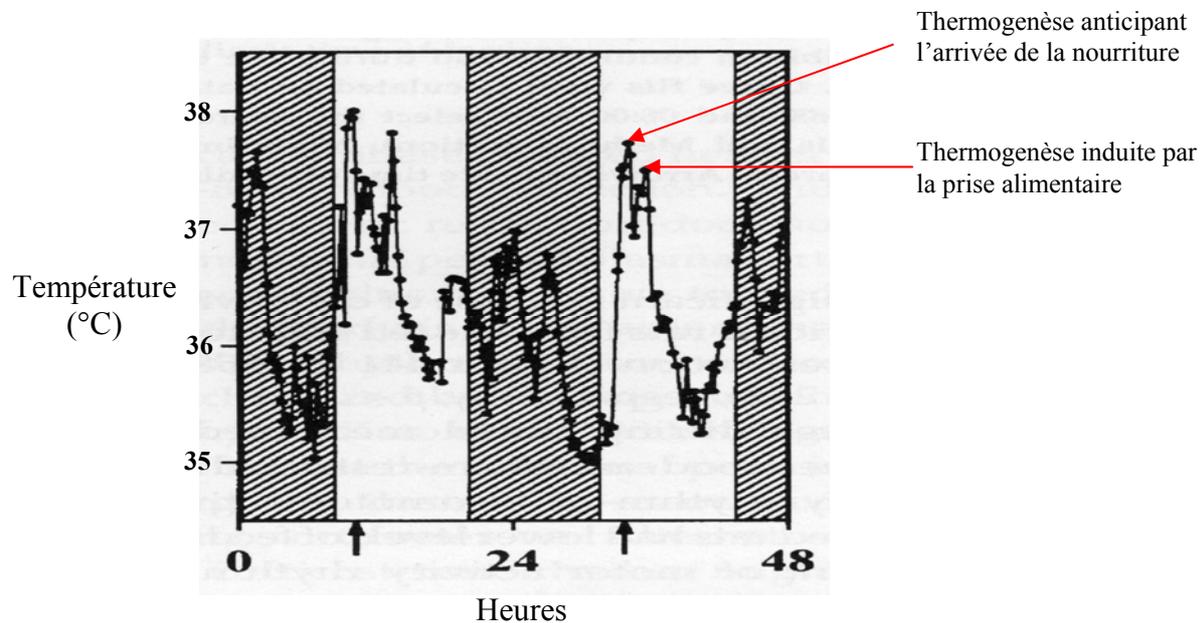


Figure 24 : Thermogenèse anticipatoire et induite par une restriction alimentaire chez le rat.

La courbe s'étale sur deux jours consécutifs, le jour et la nuit étant respectivement représentés par les rectangles blancs et hachurés. L'accès à la nourriture est figuré par les flèches noires sur l'axe des abscisses. Cet accès est précédé par une augmentation de température (FAT) corrélée avec la FAA, et suivi par un autre pic, induit par la prise alimentaire (DIT).

(Adapté de Challet et al., 1997c)

3.5. Corticostérone (FAC)

Tout comme pour la température et l'activité locomotrice, lors d'une restriction de l'accès à la nourriture, un autre **pic de corticostérone**, en plus de celui qui s'exprime en fin de jour / début de nuit en conditions *ad libitum*, apparaît en **anticipation de l'accès à la nourriture** chez des animaux intacts. Il est présent que la nourriture soit présentée de jour ou de nuit (Krieger, 1974 ; Nelson *et al.*, 1975). Son amplitude peut être supérieure chez des rats femelles par rapport aux mâles (Krieger, 1974).

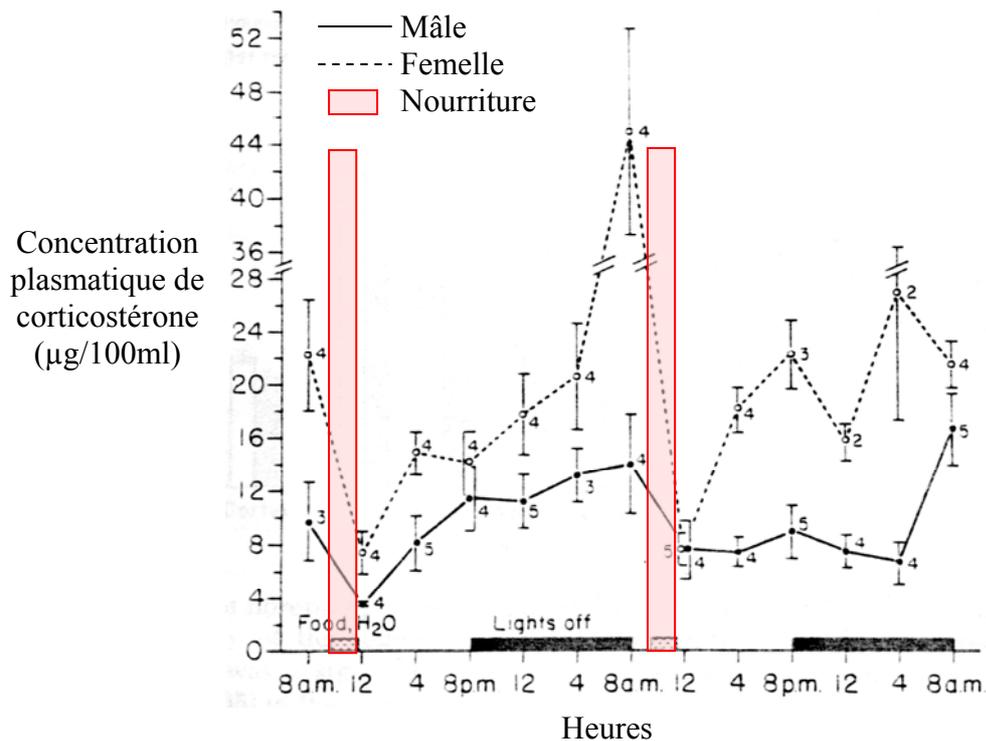


Figure 25 : Une restriction temporelle de l'accès à la nourriture entraîne le rythme journalier de corticostérone chez des rats mâles et femelles.

Courbe des concentrations en corticostérone dans le plasma (µg/100ml) de rats mâles (lignes pleines) ou femelles (lignes pointillées) soumis à une restriction temporelle de l'accès à la nourriture (accès indiqué par les rectangles rouges). Le cycle LD est reporté en abscisse, les barres noires représentant la nuit. Notez qu'à la fois chez les femelles et les mâles, un premier pic de corticostérone la nuit et un second en anticipation de la nourriture. Ce phénomène est plus marqué chez la femelle.

(Adapté de Krieger 1974).

Les niveaux de corticostérone redescendent rapidement dès que l'animal a accès à la nourriture. Ce **profil est également observé lors d'un jeûne**, mais les niveaux de corticostérone diminuent moins vite (Itoh *et al.*, 1980). La corticostérone étant associée aux phénomènes de stress, il était possible qu'une **restriction alimentaire constitue un stress**, expliquant ainsi le pic quotidien de corticostérone. Cependant l'apparition du pic de corticostérone en anticipation du repas n'est **pas corrélée avec l'apparition d'un pic d'ACTH** (Wilkinson *et al.*, 1979). De plus, un stress d'immobilisation quotidien de 2 heures entraîne une avance de phase du pic nocturne de corticostérone, mais aucun pic anticipatoire n'est observable (Otteweller *et al.*, 1987). Le pic anticipatoire de corticostérone est donc bien une **sortie du FEO** et il n'est pas relié à des phénomènes de stress.

3.6. Leptine et ghréline.

La **leptine** est un peptide relargué par le tissu adipeux blanc et la **ghréline** est libérée par les cellules oxyntiques de la muqueuse gastrique. Elles véhiculent des signaux humoraux depuis la périphérie vers les circuits neuronaux régulant l'homéostasie énergétique. Les neurones à NPY du noyau arqué sont la cible principale de ces peptides. Ghréline et leptine stimulent et

inhibent respectivement la libération de NPY, **augmentant ou diminuant en retour la prise alimentaire**. La leptine stimule le stockage des lipides dans le tissu adipeux alors que la ghréline stimule la dépense énergétique (Kalra *et al.*, 2003 pour revue).

Leptine et ghréline sont toutes deux **rythmiques dans le plasma** en conditions *ad libitum* (animaux SCN intacts). Ce **rythme est inversé** en réponse à une restriction temporelle de l'accès à la nourriture le jour, le pic plasmatique survenant avant ou après le repas principal respectivement pour la ghréline et la leptine (Bodosi *et al.*, 2004 ; Martinez-Merlos *et al.*, 2004).

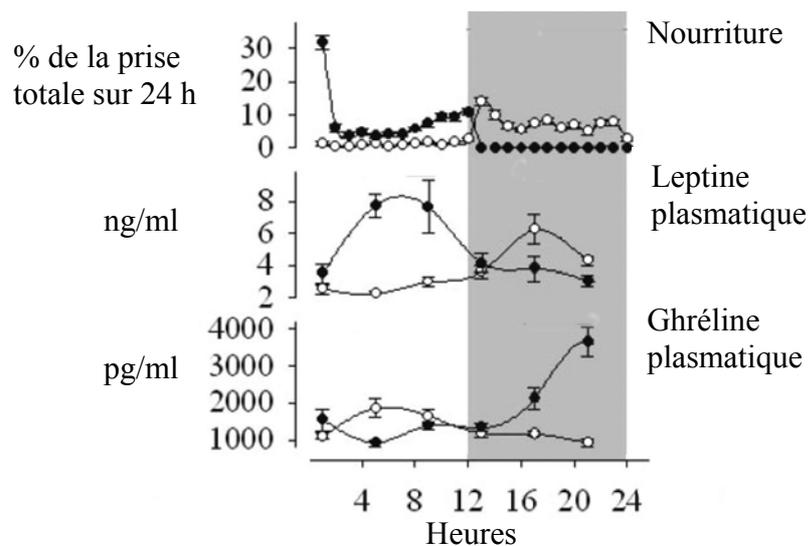


Figure 26 : Altération des rythmes de leptine et de ghréline plasmatiques lors d'un nourrissage ad libitum versus un nourrissage diurne chez le rat.

Les courbes représentent le rythme de prise alimentaire (en haut), de leptine plasmatique (au milieu) et de ghréline plasmatique (en bas), sur 24 heures, en fonction du régime alimentaire. Les symboles blancs indiquent un nourrissage *ad libitum*. Dans ce cas, les rats mangent principalement la nuit ; la leptine et la ghréline sont rythmiques avec un pic en milieu de nuit et durant le jour respectivement. Lors d'un nourrissage exclusivement le jour, un pic de prise alimentaire apparaît en début de jour. Le rythme est inversé. La phase des rythmes de ghréline et de leptine est également inversée et leur amplitude est accrue. Le jour et la nuit sont représentés par les fonds blanc et gris respectivement sur chaque graphique.

(Adapté de Bodosi *et al.*, 2004).

Les concentrations plasmatiques de leptine et de ghréline semblent donc fortement corrélées aux rythmes de prise alimentaire. Elles pourraient donc être des **entrées/sorties du FEO**. Cependant, concernant la leptine, le rythme observé en RF ne persiste pas lors d'un jeûne consécutif à la RF (Martinez-Merlos *et al.*, 2004). Il est donc probable que **la leptine réponde passivement** à la prise alimentaire. Pour la ghréline, la question reste ouverte et de plus amples expériences seront nécessaires pour répondre à cette question.

3.7. Paramètres métaboliques.

Un grand nombre de métabolites oscillent chez le rat en conditions d'alimentation *ad libitum*, c'est à dire pour une prise alimentaire prédominante dans la phase obscure du nyctémère.

Cependant, **ces rythmes journaliers ne semblent pas persister en conditions de jeûne** (Escobar *et al.*, 1998). Les auteurs rapportent une réapparition d'un rythme **d'acides gras libres** après 48 heures de jeûne, rythme non testé statistiquement et peu évident graphiquement. Par contre, les rythmes observés en conditions *ad libitum* sont perturbés lors d'une restriction alimentaire : leur amplitude a tendance à augmenter et le pic est décalé. De plus, une autre étude rapporte que le **rythme de LDL cholestérol** est décalé de 8 heures lors d'une restriction alimentaire (Velasco *et al.*, 1994). Seul le **glucose** ne semble pas affecté par la RF (Diaz-Munoz *et al.*, 2000). Cependant, le pic du rythme en conditions *ad libitum* (transition nuit/jour) ne correspond pas à ce qui a pu être rapporté par d'autres auteurs (transition jour/nuit - Kalsbeek et Strubbe, 1998 ; La Fleur *et al.*, 1999). Diaz-Munoz et collaborateurs indiquent qu'en RF, le pic se trouve quelques heures après l'accès à la nourriture. Il semblerait donc que le **glucose soit aussi affecté par une RF**.

Une autre possibilité est que les rythmes métaboliques soient la conséquence d'une **oscillation des hormones** qui contrôlent leur homéostasie, comme par exemple **l'insuline** et le **glucagon**. S'il a été démontré qu'insuline et glucagon répondaient passivement à l'accès à la nourriture (La Fleur *et al.*, 1999), il n'en demeure pas moins que ces paramètres peuvent être influencés par une RF. L'insuline atteint son nadir dans les heures qui précèdent l'accès à la nourriture, temps auquel le glucagon est au plus haut, indiquant ainsi un état catabolique dominant. Après l'accès à la nourriture, la tendance s'inverse : la quantité plasmatique d'insuline augmente et celle de glucagon diminue (Diaz-Munoz *et al.*, 2000). Une fois encore, il est difficile d'établir si les pic et nadir d'insuline et de glucagon en anticipation du repas sont **contrôlés par le FEO**. De plus amples expériences combinant des lésions des SCN à une RF et à une période de jeûne pour contrôler la persistance du phénomène seront nécessaires.

4. Réception d'un synchroniseur ?

La première caractéristique d'une horloge, pré requise pour étayer notre thèse, est que celle-ci reçoive des informations provenant de l'environnement. Il est évident cependant que pour nous assurer que cette horloge reçoit des informations, nous devons observer une modification dans l'une ou plusieurs des sorties de cette horloge. Pour l'heure, nous nous concentrerons sur la sortie la plus communément utilisée : l'activité locomotrice.

4.1. Non photique.

4.1.1. Disponibilité alimentaire.

Comme décrit par F.K. Stephan et collaborateurs en 1979, la **disponibilité alimentaire** est le premier paramètre de l'environnement qui, lorsqu'il est modifié, **engendre une adaptation de l'activité locomotrice**. Une **restriction temporelle** de l'accès à la nourriture (RF) ou une **ration hypocalorique** distribuée quotidiennement à heure fixe (RC) entraînent l'expression d'une FAA chez des animaux **SCN intacts** (Mistlberger, 1994 ; Challet *et al.*, 1997c ; Castillo *et al.*, 2004 ; Mendoza *et al.*, 2005c ; Abe *et al.*, 2007) ainsi que chez des animaux **SCN lésés**,

restaurant ainsi une rythmicité (Stephan *et al.*, 1979 ; Coleman *et al.*, 1982 ; Stephan, 2002). Dans le cas d'une RF, la FAA apparaît **quelle que soit la durée d'accès à la nourriture** (4 à 12 heures ; Stephan et Becker, 1989). De plus, les rats sont capables **d'anticiper 2 repas**, séparés par 6 ou 8 heures, mais ils n'anticipent pas 3 repas séparés chacun par 8 heures ce qui exclut un apprentissage de l'intervalle entre deux repas dans ces mécanismes. Dans le cas du protocole à 3 repas, les animaux n'anticipent que 2 repas (Stephan, 1989 ; Mistlberger, 1994). Les rats sont en outre capables de **discriminer deux accès temporels différents dans deux endroits différents** et anticipent correctement par des pressions sur un levier les heures et place de chaque accès (Boulos et Logothetis, 1990). Enfin, l'anticipation de deux repas présentés l'un toutes les 25 heures et l'autre toutes les 26 heures, donc avec des périodes différentes, est possible, bien que la FAA ne soit pas toujours stable pour les deux repas (Mistlberger, 1994 pour revue).

En plus de l'activité locomotrice, RF et RC modifient les patrons d'expression de tous les paramètres cités en section IV-3. Il est donc clair que le FEO est capable de recevoir les informations relatives à ce synchroniseur alimentaire.

4.1.2. Anticipation d'un apport en sel.

Si l'anticipation d'un accès quotidien à la nourriture est possible, il n'en est pas de même pour le sel si son accès est limité à une fois par jour, une nourriture appauvrie en sel étant distribuée *ad libitum*. Ainsi, la restriction à 2 heures par jour de l'accès à une solution salée ou à de la nourriture salée n'entraîne pas de comportement anticipatoire (activité de roue), y compris si les animaux ont subi des traitements supposés augmenter l'appétence pour cet élément (Rosenwasser *et al.*, 1985).

4.1.3. Anticipation d'un seul nutriment.

Des rats n'anticipent pas un accès quotidien à une source de carbohydrates, protéines ou lipides (activité de roue, activité générale ou approche de la mangeoire), les autres nutriments étant disponibles *ad libitum* (Mistlberger *et al.*, 1990). Par contre, les rats sont capables **d'anticiper 2 repas, chacun constitué d'un seul nutriment**, les deux nutriments étant complémentaires (protéines et carbohydrates ou protéines et lipides). Dans ce cas, la quantité de calories ingérées est réduite. Même si une restriction calorique n'est normalement pas nécessaire à l'expression de la FAA (Mistlberger et Rusak, 1987), il semble que **la teneur énergétique** (absolue ou relative à la prise alimentaire totale) d'un repas composé d'un seul nutriment soit **importante** pour que ce nutriment ait un pouvoir de synchronisation sur le FEO (Mistlberger *et al.*, 1990). Cette hypothèse est partiellement confirmée par une autre étude sur la capacité d'un nutriment unique (glucose, saccharine, huile végétale ou minérale) à décaler la FAA après un décalage horaire de l'accès à la nourriture (Stephan et Davidson, 1998). Des animaux entraînés à une RF présentent une FAA qui se resynchronise en quelques jours après un décalage de l'accès à la nourriture (voir section IV-6-1). Seul un repas constitué de **glucose** avait la **capacité de remettre rapidement à l'heure le FEO**. Pour les

autres nutriments, soit la remise à l'heure était lente (saccharine), soit la FAA était diminuée, à la fois pour l'activité de roue et l'approche de la mangeoire (huiles). Il est donc possible que l'huile, malgré un contenu calorique important, ne soit pas un *zeitgeber* satisfaisant pour entraîner le FEO, peut être à cause de son absorption plus lente par le système digestif (Stephan et Davidson, 1998).

4.1.4. Repas appétitifs

La question a été posée de savoir si la **restriction** était une composante nécessaire pour qu'une FAA se développe. Un protocole a ainsi été mis en place où un accès quotidien de jour à une **pâte à base de chocolat** ou de beurre de cacahuète, est associé à une **nourriture *ad libitum***. En quelques jours, une **FAA** se développe, qui est similaire à celle observée dans les protocoles de RF classiques (Mistlberger et Rusak, 1987 ; Mendoza *et al.*, 2005a). La prise alimentaire nocturne diminue d'autant plus que la quantité de pâte chocolatée ingérée augmente. Par contre, **aucune FAA** n'est observable si la pâte chocolatée est **dépourvue de valeur nutritive** ou si sa quantité est limitée à quelques grammes par jour (Mistlberger et Rusak, 1987). Il semble donc qu'un repas d'une **valeur nutritive significative** soit requis pour qu'une anticipation se manifeste. Par contre, une **restriction quantitative de la nourriture n'est pas nécessaire pour induire la FAA**. Cette observation, effectuée chez le rat a été dans une certaine mesure confirmée avec le hamster doré, chez lequel la FAA en réponse à un accès quotidien à une pâte chocolatée ne s'exprime que si les SCN sont endommagés ou la nourriture traditionnelle légèrement limitée (Abe et Rusak, 1992).

4.1.5. Eau.

Si une modification de la disponibilité alimentaire entraîne de manière évidente un oscillateur alimentaire, il ne semble pas en être de même pour la **disponibilité en eau**. Chez le hamster, une restriction à 2 heures d'accès quotidien à un biberon durant le jour entraîne l'apparition d'une composante d'anticipation, la nourriture étant distribuée *ad libitum*. Cependant cette restriction s'accompagne d'une **modification du patron de prise alimentaire**, un repas important (jusqu'à 55% de la prise quotidienne) apparaît durant la période d'accès à l'eau de boisson (Mistlberger, 1993). Dans ce cas, il n'est pas possible de s'affranchir de l'influence de la réorganisation de la prise alimentaire. Cette possibilité est également abordée dans une étude où l'accès à l'eau de boisson est limité à une demi-heure par jour. Dans ce cas, un **pic anticipatoire de corticostérone** apparaît avant l'accès au biberon et diminue la sécrétion d'hormone de croissance (growth hormone : GH) et d'hormone stimulant la thyroïde (Thyroid stimulating hormone : TSH). Les auteurs attribuent cependant ces phénomènes à une **réduction concomitante de la prise alimentaire** (Armario et Jolin, 1986). R. Mistlberger a mis en place un protocole permettant de **dissocier la composante alimentaire de la prise hydrique** afin de déterminer si l'oscillateur alimentaire était également influencé par la disponibilité en eau, et si différentes sorties de l'oscillateur pouvaient répondre différemment. Il a ainsi restreint l'accès à l'eau à une heure par jour, en milieu de jour, et l'accès à la

nourriture à la période nocturne. Dans ce protocole les rats ne présentaient **jamais d'anticipation de l'accès à l'eau** dans leur activité de roue. Quelques rats seulement présentaient une petite anticipation dans le comportement d'approche du biberon. Lorsque l'accès à l'eau et à la nourriture étaient séparés de 7, 10 ou 12 heures, alors que l'anticipation de la nourriture était évidente, l'anticipation de l'eau était faible voire inexistante (Mistlberger, 1992). L'eau, si elle peut être un zeitgeber pour l'oscillateur alimentaire, n'a en tout cas pas la même puissance de synchronisation que la nourriture.

4.1.6. Pharmacologie.

La méthamphétamine est un agoniste catécholaminergique. Une **injection quotidienne de méthamphétamine induit un comportement rappelant la FAA**, l'activité augmentant dans les 2 heures suivant l'injection et continuant pendant plusieurs heures (Shibata *et al.*, 1994 ; Shibata *et al.*, 1995). Une étude récente démontre qu'une injection quotidienne **d'adrénaline**, mais pas de noradrénaline, induit une **anticipation dans le comportement de prise hydrique**. Cette anticipation n'est cependant pas aussi intense que celle observée lors d'une RF (Mendoza *et al.*, 2003). Il est donc possible que la « FAA » observée pour l'injection quotidienne de méthamphétamine soit médiée par les **récepteurs adrénérgiques**. L'activité locomotrice induite par la méthamphétamine est également observée chez des animaux présentant des **lésions des SCN** (Iijima *et al.*, 2002). De plus, ce type de protocole provoque une **modification de l'expression des gènes horloges** (*Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Npas2*) dans le striatum, mais pas dans les SCN (Iijima *et al.*, 2002).

Un traitement chronique de rats présentant des lésions des SCN avec de la méthamphétamine distribuée dans l'eau de boisson peut induire une **restauration du rythme d'activité locomotrice en libre cours** (Honma *et al.*, 1987a). Ce rythme n'est pas dépendant du cycle LD, mais il peut être **entraîné par une RF**. Cependant, dans ce cas la FAA n'apparaît pas en anticipation de l'accès à la nourriture, mais après l'accès à la nourriture. Une **FAA « traditionnelle »** est par ailleurs **absente** dans ce type de protocoles (Honma *et al.*, 1989). Deux interprétations sont possibles pour ce phénomène : soit la méthamphétamine agit sur une **autre horloge que le FEO**, ce qui expliquerait qu'une période de libre cours apparaisse lorsque la méthamphétamine est délivrée de manière chronique dans l'eau de boisson, démasquant ainsi cette horloge ; soit la méthamphétamine **agit directement sur le FEO** et modifie l'entraînement du FEO à la nourriture. Cette seconde hypothèse est plus probable, sachant qu'aucune activité n'est observable en anticipation du nourrissage alors que le FEO doit toujours fonctionner.

4.2. Photique.

Les SCN semblent être LA structure dédiée à la réponse photique. Si la nourriture peut influencer sur la synchronisation des SCN (Challet *et al.*, 1997c ; Challet *et al.*, 1998 ; Mendoza *et al.*, 2005c), **il ne semble pas en être de même pour la lumière sur le FEO**, les animaux SCN lésés étant arythmiques dans tous les paramètres mesurés en absence de restriction

alimentaire. De plus, l'expression de la **FAA est indépendante des conditions lumineuses** chez des animaux SCN lésés (Yoshihara *et al.*, 1997). Cependant, si des rats sont restreints à 2 heures d'accès à la nourriture 2 heures après l'allumage des lumières, la FAA s'exprime alors à la transition jour/nuit ; lorsque la nourriture est de nouveau distribuée *ad libitum*, la FAA disparaît. Elle réapparaît normalement lors d'un jeûne à l'heure attendue du repas. Si, durant la période *ad libitum*, le cycle LD a été avancé ou retardé, la FAA réapparaît lors d'un jeûne non pas à l'heure précédent le décalage horaire, mais à la nouvelle transition jour/nuit, c'est à dire à la même phase du nyctémère (Otteweller *et al.*, 1990). De plus, lorsque des rats soumis à une **restriction calorique en LD** sont par la suite relâchés en conditions *ad libitum en DD*, la **FAA peut continuer en libre cours**, parallèlement à l'activité contrôlée par les SCN, durant quelques jours (Challet *et al.*, 1998).

Ces études démontrent que même si le **FEO** n'est pas directement sensible à la lumière, il est très probable qu'il soit **couplé aux SCN**, qui serviraient alors de repère de phase par rapport au cycle LD, qui influencerait ainsi indirectement sur le FEO (voir Stephan, 1986).

5. A la frontière entre réception et distribution : Connectique de l'horloge alimentaire.

Se basant sur un ensemble d'expériences combinant lésion ou blocage d'un système de neurotransmetteurs et protocoles de restriction alimentaire, un certain nombre de voies possiblement impliquées dans le transport des informations vers ou depuis le FEO ont été dégagées.

5.1. Systèmes de neurotransmetteurs et neuropeptides

5.1.1. Le système glutamatergique

Parmi les systèmes de neurotransmetteurs impliqués dans une certaine mesure dans l'expression de la FAA, le **système glutamatergique**, largement réparti dans le système nerveux central, semble être incontournable. Le **blocage des récepteurs NMDA** au glutamate par une injection quotidienne de l'agoniste non compétitif MK-801 **réduit** de manière dose dépendante l'expression de la **FAA** (Ono *et al.*, 1996). Malheureusement, connaissant la répartition très large de ce système, il est impossible de déterminer si la FAA disparaît suite à une impossibilité du FEO de transmettre son message ou suite à l'acheminement défectueux des informations vers le FEO. Il est donc probable que les effets observés soient **peu spécifiques**.

5.1.2. Le système dopaminergique.

Les neurotransmetteurs impliqués dans la FAA peuvent être identifiés en traitant des rats avec des **agonistes ou des antagonistes** de ces neurotransmetteurs avant l'accès à la nourriture. C'est l'approche qui a été utilisée pour la **dopamine**. Le **noyau accumbens** et ses afférences dopaminergiques semblent responsables de l'augmentation de l'activité lors d'un jeûne ou de

l'hyperactivité induite par une injection d'amphétamines. **L'activité dopaminergique dans le noyau accumbens est augmentée avant l'heure du nourrissage** dans les protocoles de restriction alimentaire (Mistlberger et Mumby, 1992). Inversement, l'ingestion d'un repas quotidien non nutritif mais appétant n'entraîne pas la FAA et n'augmente pas le métabolisme dopaminergique dans le noyau accumbens. Le **système dopaminergique mésolimbique** pourrait donc véhiculer les **messages afférents au FEO** ou faire partie intégrante du FEO. Un traitement quotidien à **l'halopéridol** (antagoniste des récepteurs à la dopamine) de rats en RF diminue le niveau de base d'activité mais **n'empêche pas l'expression de la FAA**, qui persiste en conditions de jeûne (Mistlberger et Mumby, 1992). Il est donc probable que le **système dopaminergique ne soit essentiel ni à la génération de la FAA, ni à son maintien.**

5.1.3. Le système noradrénergique.

Ear2 (Nr2f6), COUP-TFI et COUP-TFII sont des membres de la sous famille des **récepteurs orphelins** et sont impliqués dans la formation des neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Ear2 peut homo- ou hétéro-dimériser avec COUP-TFI et COUP-TFII (Avram *et al.*, 1999) et se fixer à des séquences activatrices dans le promoteur de multiples gènes. Chez des **souris Ear2^{-/-}**, la majeure partie du **locus coeruleus est absente** ; Or cette structure est à l'origine de l'essentiel des projections **noradrénergiques** chez les mammifères vers un grand nombre de structures cérébrales, particulièrement dans le télencéphale (Warnecke *et al.*, 2005). Aston-Jones et collaborateurs (2001) ont rapporté que la fréquence de décharge des neurones du *locus coeruleus* présente un rythme circadien, suggérant une participation de cette structure dans la **transmission des rythmes** (Aston-Jones *et al.*, 2001). Il envoie d'ailleurs des projections vers les SCN. Partant de l'observation que le rythme de *Per1* est amorti dans le cortex frontal des souris Ear2^{-/-}, et que ce mutants s'adaptent plus lentement que de souris sauvages à un décalage horaire, l'hypothèse a été avancée que **ces mutants avaient un système de mesure du temps altéré** (Warnecke *et al.*, 2005). Il était donc possible que ce défaut se répercute sur **l'adaptation à une restriction alimentaire**. En effet, lorsque les souris Ear2^{-/-} étaient soumises à une RF, la **FAA était significativement réduite** par rapport aux souris sauvages. De même, une **réduction drastique de la quantité de noradrénaline** était observée dans le cortex frontal des mutants (Warnecke *et al.*, 2005). Même si la réduction de FAA est évidente dans cette expérience, la noradrénaline peut ne pas être le seul neurotransmetteur responsable de ces effets : les neurones du *locus coeruleus* expriment également des neuropeptides comme l'AVP, la galanine ou le NPY. Leur absence peut être responsable plus ou moins directement de la diminution de la rythmicité dans le cortex frontal et de la réduction de la FAA. De plus, **aucune expression de gènes horloges connus** n'a pu être détectée **dans le locus coeruleus**, ce qui indiquerait que cette structure **n'abriterait pas d'oscillateur** et ne serait donc qu'un **relais** vers le cerveau antérieur. Ce rôle de relais pourrait être appliqué aussi bien pour les SCN que pour le FEO. Dans ce dernier cas,

une perturbation de la fonction du *locus coeruleus* pourrait conduire à un **acheminement partiel des entrées au FEO** ou à des signaux de sortie incomplets vers les effecteurs du FEO, aboutissant à une diminution de la FAA.

5.1.4. Le système histaminergique.

Une cartographie des **noyaux cérébraux activés durant la FAA** et formant une voie ascendante **promouvant l'éveil** a pu être réalisée dans une expérience utilisant l'expression de c-FOS. Les résultats indiquent que les **neurones histaminergiques** dans la partie ventrale des noyaux tubéromammillaires sont activés **en anticipation du nourrissage** (Inzunza *et al.*, 2000). Les auteurs proposent que l'augmentation de l'activation des noyaux tubéromammillaires **contribue à l'éveil des animaux durant la FAA**. De plus il a été démontré ultérieurement que 35% des neurones histaminergiques de cette structure étaient activés en anticipation du nourrissage puisqu'ils expriment c-FOS à un niveau maximal durant la FAA (Meynard *et al.*, 2005). De nouvelles études devront être réalisées afin de déterminer l'importance des neurones histaminergiques dans le transport des informations et l'éveil associé à la FAA.

5.1.5. Le système opioïdérique.

Durant **l'activation d'un comportement anticipatoire d'une récompense** (ici la nourriture), le système opioïdérique mésolimbique est activé et permettrait de surmonter la fatigue pour accomplir une tâche (ici la recherche alimentaire sous forme d'activité locomotrice ; Spruijt *et al.*, 2001). L'aire tegmentale ventrale contient les corps cellulaires des neurones dopaminergiques des aires mésolimbiques. Sur ces neurones, les **récepteurs aux opioïdes**, parmi lesquels les récepteurs **μ-opioïdes**, augmentent la libération de dopamine dans le striatum ventral lorsqu'ils sont activés. Des **souris KO pour les récepteurs μ-opioïdes** présentent une **diminution de la FAA** lorsqu'ils sont soumis à une restriction alimentaire, comparés aux souris sauvages. Ils présentent un **patron d'activité différent** des souris sauvages pour lesquelles la quantité d'activité durant la FAA est supérieure à la quantité d'activité durant l'accès à la nourriture. Chez les souris KO, la quantité d'activité est équivalente avant et pendant l'accès à la nourriture. Notons que la perte de poids est équivalente pour les deux génotypes (Kas *et al.*, 2004). Sachant que les récepteurs μ-opioïdes **régulent l'activité des neurones dopaminergiques mésolimbiques**, il est possible que ceux-ci aient **perdu leur capacité d'activation** suite à l'invalidation des récepteurs μ-opioïdes, ce qui expliquerait éventuellement la diminution de la FAA. Or, une injection sous cutanée de **d-amphétamine**, agoniste du système dopaminergique, induit une augmentation de l'activité locomotrice plus importante chez les souris KO que chez les souris sauvages. Cela démontre que **les neurones dopaminergiques sont toujours activables** (Kas *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent **un rôle des opioïdes** dans l'adaptation comportementale à des récompenses, ici la disponibilité alimentaire. Cette hypothèse a été confirmée récemment par Yoshida et collaborateurs qui démontrent que le **rythme d'expression des récepteurs μ-opioïdes**, qui

présente un pic d'expression au début de la phase obscure en conditions *ad libitum*, est **décalé vers le début du jour en RF** (nourrissage en début de jour). Ce pic est concomitant du pic de corticostérone dans les deux conditions, et le rythme journalier d'expression de l'ARNm des récepteurs μ -opioïdes est **aboli chez des animaux surrénalectomisés** (Yoshida *et al.*, 2006). Il est donc probable que le **système opioïdérique** soit impliqué dans la modulation des comportements associés à une récompense, mais de manière indirecte **via les glucocorticoïdes**.

5.1.6. Le système orexinergique.

Les **orexines (ou hypocrélines) A et B** sont des neuropeptides pour lesquels on peut trouver des récepteurs (orexine-1 et orexine-2) dans le télencéphale, les noyaux hypothalamiques, thalamiques, le tronc cérébral et la moelle épinière. Les **neurones orexinergiques** sont exclusivement localisés dans l'**hypothalamus**, majoritairement dans l'aire périfornicale, les noyaux hypothalamiques dorsomédiaux et l'aire hypothalamique latérale (Peyron *et al.*, 1998). Ils projettent vers un grand nombre d'aires cérébrales, et particulièrement dans l'hypothalamus. Parmi les projections extra-hypothalamiques, la plus importante arrive dans le *locus coeruleus*. Des fibres ont également été identifiées comme projetant sur le septum, le BNST, les noyaux paraventriculaire et *reuniens* du thalamus, la zona incerta, le noyau subthalamique, la *substantia nigra*, les noyaux du raphé, l'aire parabrachiale, la formation réticulée médullaire et le noyau du tractus solitaire. Des projections moins importantes ont été observées vers les régions corticales, l'hippocampe, les noyaux amygdaloïdes antérieur et central et les bulbes olfactifs (Peyron *et al.*, 1998 ; Date *et al.*, 1999).

Les **orexines**, administrées **dans les ventricules cérébraux** par exemple, **augmentent l'activité locomotrice et les comportements motivés**. Elles coordonnent également les patrons de veille/sommeil (Hagan *et al.*, 1999). De plus, des **souris déficientes** pour le gène codant pour les orexines ou n'ayant pas de neurones à orexines présentent un phénotype similaire à la **narcolepsie humaine** (Chemelli *et al.*, 1999). Une relation étroite a également été établie entre orexines et nourriture puisqu'une injection centrale d'orexines **déclenche la prise alimentaire** (Mignot *et al.*, 2002). Connaissant l'importance des orexines dans la coordination de l'éveil et dans les comportements motivés comme la recherche alimentaire, Akiyama et collaborateurs (2004) ont testé **l'activation des neurones à orexines** (immunoréactivité pour c-FOS) en réponse à une restriction alimentaire. L'apparition de la **FAA** a de plus été mesurée chez des souris sauvages ou chez des **souris mutantes** présentant une dégénérescence précoce des neurones à orexines, suite à la co-expression du gène de l'orexine avec la partie C-terminale de l'ataxine-3. L'ADNc de l'ataxine-3 possède une extrémité anormalement longue codant pour une queue de polyglutamines et induit l'apoptose des cellules lorsqu'elle est exprimée de manière exogène (Hara *et al.*, 2001). La **RF décale de 6 heures le pic d'expression de c-FOS dans les cellules à orexines** de la nuit vers le jour chez des souris sauvages. Il est intéressant de constater que **la FAA est réduite chez les**

souris mutantes. Il semble que les neurones à orexines ne soient pas responsables de la génération de la FAA en elle-même mais qu'ils **participeraient à l'éveil** concomitant de la FAA (Akiyama *et al.*, 2004).

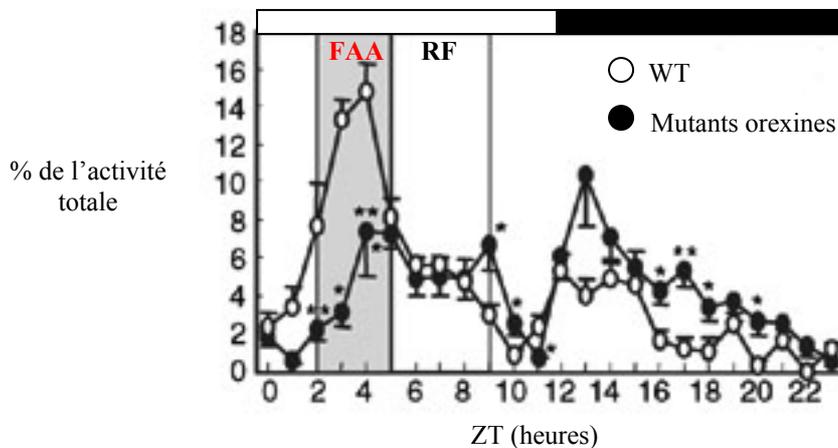


Figure 27 : Diminution de la composante d'anticipation chez des souris mutantes pour les orexines.

Les courbes noire (souris mutantes) et blanche (souris WT) représentent la quantité d'activité de roue pour une heure d'enregistrement, en % de l'activité totale journalière. La nourriture est distribuée entre ZT5 et ZT9 (indiqué par l'abréviation RF dans le rectangle blanc à l'intérieur du graphique). Le cycle LD est figuré par les rectangles horizontaux noir (nuit) et blanc (jour) au dessus du graphique. Noter que la FAA (dans le rectangle gris) est réduite chez les souris mutantes orexines.

(Adapté de Akiyama et al., 2004).

Ces résultats ont été confirmés par une autre étude recherchant l'implication des orexines dans l'établissement et le maintien de la FAA induite par la restriction alimentaire (Mieda *et al.*, 2004) chez la même souche de souris. Cependant, **l'ablation des neurones à orexine dans l'hypothalamus latéral** suite à une injection dans cette structure d'hypocrétine-2 couplée à une saporine (protéine inactivant les ribosomes) **n'abolit pas la composante d'anticipation** de boisson et d'approche de la mangeoire chez des rats (Mistlberger *et al.*, 2003). Les rats deviennent cependant hypophagiques, hypodipsiques et perdent du poids. Malgré cela, l'amplitude des rythmes de prise hydrique et de prise alimentaire est conservée.

Ces études utilisent des **mesures du comportement anticipatoire sur différents paramètres** et ne sont par conséquent **pas totalement comparables**. Il est ainsi possible que l'anticipation n'ait pas été visible dans l'étude de Mistlberger et collaborateurs si les auteurs avaient mesuré l'activité locomotrice, et inversement que la mesure de la prise hydrique n'ait pas révélé d'altération de la composante d'anticipation dans les études d'Akiyama et collaborateurs et de Mieda et collaborateurs. De plus, dans les premières études, la totalité des neurones à orexines et leurs projections ont été supprimés alors que dans la seconde, seuls les neurones de l'hypothalamus latéral ont été détruits.

L'ensemble de ces résultats suggère que **les neurones à orexines pourraient véhiculer des signaux efférents depuis le FEO**, augmentant ainsi l'éveil et maintenant les comportements anticipatoires dans les heures précédant l'accès à la nourriture. Ils ne seraient pourtant **pas à l'origine de la genèse de la FAA**. Dans des conditions naturelles, ces neurones pourraient être essentiels pour que l'animal exprime un comportement de recherche alimentaire en réponse à une réduction de la disponibilité alimentaire. De plus amples investigations seront nécessaires pour établir si les neurones orexinergiques sont essentiels à la composante locomotrice de l'anticipation, ou à d'autres sorties du FEO comme le pic anticipatoire de corticostérone ou de température.

6. Intégration des synchroniseurs.

Dans les SCN, il avait été possible de démontrer l'intégration d'un synchroniseur à la fois par le changement d'un paramètre physiologique et par la modification de l'expression des gènes horloges. Cette dernière méthode n'est pas accessible en ce qui concerne le FEO, premièrement parce que l'on ne connaît pas de manière précise la machinerie moléculaire du FEO et ensuite parce qu'on n'a pas accès à son substrat anatomique, ce qui nous interdit toute analyse moléculaire *in situ*.

Par contre, le simple fait que chez des animaux SCN lésés ayant des profils d'activité, de température, de corticostérone arythmiques, on puisse restaurer des rythmes par une restriction alimentaire pour ces trois paramètres (voir sections 3 de cette partie), démontre que l'information est intégrée. Une structure intègre et redistribue donc un message rythmique à ses sorties, les synchronisant ainsi à 24 heures.

D'autres expériences vont également dans le même sens :

6.1. Décalage horaire de l'accès à la nourriture.

Lors d'expériences de **décalage horaire** sur les SCN, les animaux expriment des **transitions de l'activité locomotrice** avant de se resynchroniser au nouveau cycle LD (Daan et Aschoff, 2001). Partant de l'idée qu'une horloge, lorsqu'elle est synchronisée à un élément de son environnement va être **mise à l'heure progressivement** si cet indicateur est déplacé dans le temps, la réaction du FEO, et donc de ses sorties, a été testée en réponse à des décalages de l'heure d'accès à la nourriture. Des animaux aux SCN lésés ont été entraînés à 2 heures quotidiennes d'accès à la nourriture, puis cet **accès a été avancé ou retardé de 4, 6 ou 8 heures**. Tous les rats exposés à des retards de phase répondaient par des **transitions** dans l'activité locomotrice qui apparaissait chaque jour un peu plus tard, se rapprochant ainsi de la nouvelle heure d'accès à la nourriture. Ces transitions ne sont évidentes à la fois dans l'initiation et l'extinction de la FAA que pour un retard de 8 heures, mais sont visibles dans le début de l'activité anticipatoire pour 4 heures et 6 heures de décalage (Figure 28). Dans le cas d'avances de phase de l'accès à la nourriture, soit aucune transition n'était observée et la FAA apparaissait en anticipation de la nouvelle heure du nourrissage en quelques jours, soit des

transitions étaient observées dans l'activité locomotrice. Dans ce cas, la FAA se décalait chaque jour vers le nouvel accès à la nourriture, non pas par des avances de phase, mais par des **retards de phase**, tout comme dans le premier cas. Une association des deux phénomènes (réapparition spontanée et transitions) a également pu être observée (Stephan, 1984 ; Mistlberger, 1994).

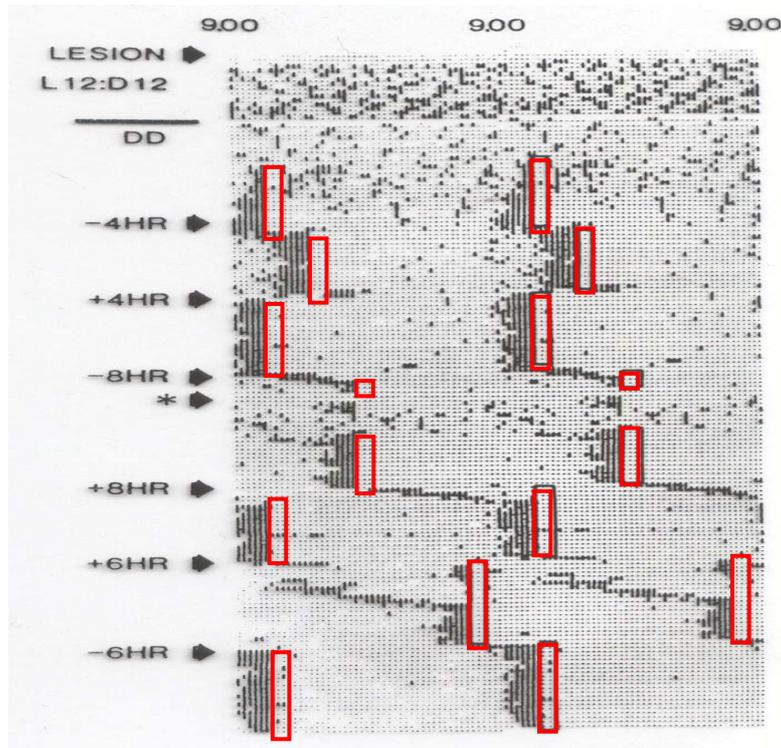


Figure 28 : Décalage horaire de l'accès à la nourriture chez des rats SCN lésés.

Actogramme en double représentation d'un rat ayant subi une lésion des SCN (indiqué par la flèche en haut de l'actogramme) suivie d'une restriction temporelle de l'accès à la nourriture (indiquée par les rectangles rouges). Les rats, initialement placés es LD, sont alors transférés en DD. En quelques jours, une FAA apparaît. L'accès à la nourriture est ensuite décalé de plusieurs heures (indiqué à gauche de l'actogramme). La FAA se décale progressivement vers le nouvel accès à la nourriture. L'étoile correspond à une période de jeûne où la FAA réapparaît à l'heure attendue.

(Adapté de Stephan 1984).

Ces résultats accroissent la possibilité que le FEO soit non pas un oscillateur mais bien une horloge. En effet, les transitions successives ne sont pas explicables par des phénomènes de mémoire ou de conditionnement. Si c'était le cas, la FAA disparaîtrait à la première heure d'accès pour réapparaître à la seconde sans transition, ou encore deux FAA coexisteraient quelques jours avant que seule la deuxième s'exprime. Nous avons donc ici un argument fort pour dire que **le FEO serait en fait une horloge**.

6.2. Limites de l'entraînement.

La FAA, sortie comportementale du FEO, ne peut s'exprimer en réponse à une RF que si la **période de présentation de la nourriture se trouve dans le domaine circadien** : ainsi, des

rats SCN lésés sont capables de présenter une FAA si la nourriture est présentée au moins toutes les **23 heures** (mais pas moins) et au plus toutes les **32 heures** (mais pas plus). En dehors de cette fourchette circadienne, l'activité locomotrice est rythmique (et ce malgré le fait que les animaux soient SCN lésés) mais avec une période différente de celle du zeitgeber (présentation de la nourriture). Cet **échappement** est typique des conditions où **l'entraînement n'est pas possible** (Stephan, 1981 ; Mistlberger, 1994).

Une fois encore, ce phénomène ne peut être attribué seulement à des processus de mémoire : effectivement, il n'est pas explicable dans ce cadre qu'un animal puisse estimer une fourchette de temps de 23 ou 24 heures, mais pas une période de 22 heures.

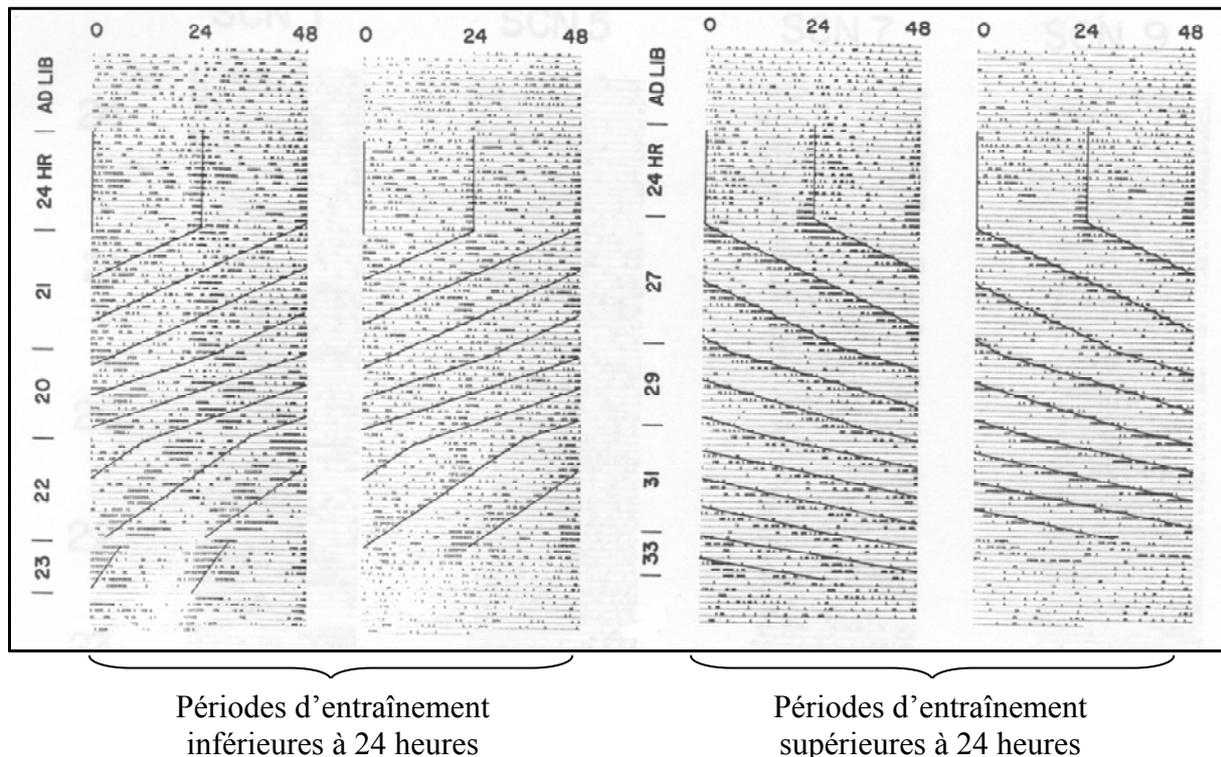


Figure 29 : Limites d'entraînement de la FAA à différentes périodes d'accès à la nourriture.
Actogrammes en double représentation de rats ayant subi des lésions des SCN. Les animaux sont en DD et les heures sont reportées en haut de chaque actogramme. L'indication « AD LIB » correspond à la période où les animaux sont nourris *ad libitum*. Dans ce cas, ils sont arythmiques. Les rats sont ensuite soumis à une restriction temporelle de l'accès à la nourriture, celle-ci étant disponible toutes les 20 à 33 heures. Les lignes à l'intérieur des actogrammes indiquent le début de l'accès. Si les rats sont capables d'anticiper chaque période, la FAA précède la ligne à chaque fois. C'est le cas pour les périodes comprises entre 23 et 31 heures, mais pas au delà. La FAA n'est alors plus observable avant l'accès à la nourriture. A la fin de l'expérience, les animaux sont de nouveau laissés en conditions *ad libitum*.

(Adapté de Stephan 1981).

7. Fonctionnement de l'horloge alimentaire : élaboration du message rythmique ?

7.1. Des gènes horloges ?

Nous avons vu en section II-4 que l'élaboration d'un message circadien par les SCN reposait sur des **boucles moléculaires** impliquant un ensemble de **gènes horloges**. Ces gènes horloges

étant exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules d'un organisme, de nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que si une horloge tissulaire existait hors des SCN, elle devait probablement fonctionner sur le même modèle que ceux-ci. De la même manière que l'utilité de tel ou tel gène horloge pour le fonctionnement des SCN a été établie sur la base d'études réalisées chez des animaux mutants, des **souris mutantes** pour divers gènes horloges ont été utilisées pour répondre à cette question concernant le FEO. Ainsi ces animaux ont été soumis à une restriction alimentaire, considérant que si la mutation n'affecte pas l'expression de la FAA, alors le gène n'entre pas dans la machinerie du FEO et inversement qu'une mutation affectant l'une ou l'autre des sorties du FEO indiquerait l'implication du gène dans la synchronisation alimentaire et donc probablement dans les mécanismes moléculaires du FEO.

7.2. Les KO pour les gènes horloges.

7.2.1. *Clock*.

Le premier gène testé dans le domaine, a été le **gène *Clock***, membre de la boucle positive principale des SCN. Considérant que *Clock* était important pour les SCN il apparaissait logique qu'il le soit également dans le FEO. Cependant, lorsque ces souris mutantes ont été soumises à un accès à la nourriture quotidien de 4 heures, elles présentaient une **FAA normale**. Cette observation était indépendante des conditions lumineuses puisque valable à la fois en LD et en DD, condition où les souris *Clk/Clk* sont arythmiques (Pitts *et al.*, 2003). Il semblerait donc que ***Clock* ne soit pas essentiel** pour l'expression de la FAA. Il est donc probable qu'il n'entre pas dans la machinerie moléculaire de la FEO.

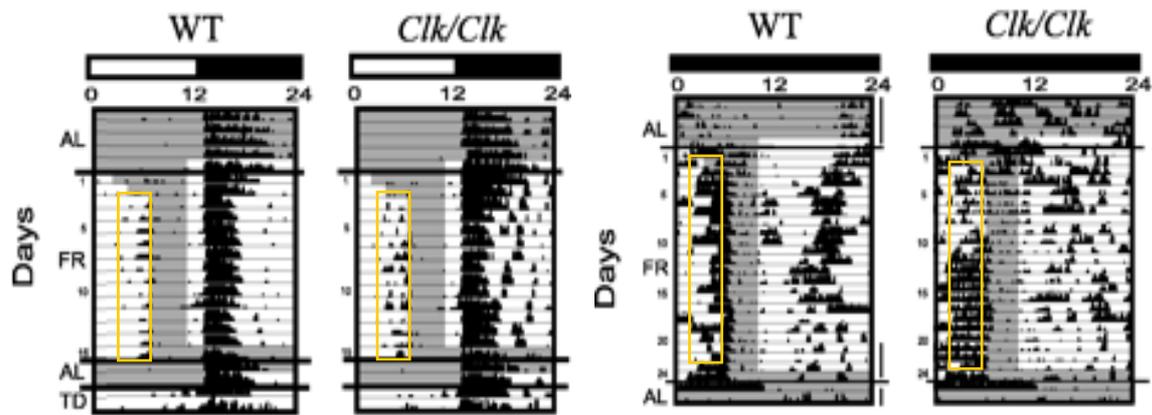


Figure 30 : Actogrammes représentatifs de deux souris sauvages (WT) et deux souris mutantes pour le gène *Clock* (*Clk/Clk*) en LD (gauche) ou en DD (droite), soumises à une restriction alimentaire.

Le régime lumineux est indiqué au dessus de chaque actogramme. La zone grisée correspond à la période durant laquelle la nourriture est disponible. Les rectangles jaunes indiquent la FAA. Celle-ci est évidente pour les deux génotypes aussi bien en LD qu'en DD. Après la restriction alimentaire, les animaux en LD sont replacés en conditions *ad libitum* quelques jours, puis soumis à un jeûne pour contrôler la réapparition de la FAA. Elle n'est évidente dans aucun des génotypes.

AL : nourriture *ad libitum* ; FR : restriction alimentaire ; TD : jeûne.

(Adapté de Pitts et al., 2003).

7.2.2. *Npas*.

Considérant que le gène *Clock* ne serait pas impliqué dans la machinerie moléculaire sous-tendant le fonctionnement circadien de l'horloge alimentaire, un **autre partenaire possible de *Bmal1*** a été recherché.

De nombreux autres facteurs de transcription comprenant des **domaines bHLH-PAS** et ont été identifiés. Parmi eux, la famille des gènes **NPAS** (neuronal PAS domain protein) compte trois membres : **NPAS1**, **NPAS2** et **NPAS3**. Ils sont exprimés majoritairement dans le système nerveux central, bien que NPAS2 et NPAS3 soient également présents dans quelques tissus périphériques (Zhou et al., 1997 ; Brunskill et al., 1999).

En 2001, **NPAS2** est identifié comme **analogue de CLOCK** dans le cerveau antérieur. Il n'est pas exprimé à des niveaux détectables en hybridation *in situ* dans les SCN. Cependant, des études récentes indiquent qu'il dimériserait avec BMAL1 dans les SCN en absence de *Clock* (DeBruyne et al., 2006, DeBruyne et al., 2007). Il a en outre été démontré que la co-induction de NPAS2 avec BMAL1 pouvait **activer la transcription des gènes *Per* et *Cry***. NPAS2 pourrait donc intervenir dans des mécanismes d'horloges dans le système nerveux central, et particulièrement à l'extérieur des SCN (Reick et al., 2001). Il remplacerait ou agirait de concert avec CLOCK, **dimérisant avec BMAL1** pour activer la transcription d'autres gènes.

Considérant qu'une modification de la disponibilité alimentaire peut influencer sur le comportement circadien des rongeurs (FAA), des pistes ont été explorées pour trouver un

relais entre métabolisme et horloge : en 2001, Rutter et collaborateurs établissent que la balance entre les facteurs $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ et NADH/NADPH (cofacteurs impliqués dans le métabolisme du glucose) est importante pour l'activation des dimères NPAS2/BMAL1. La forme réduite favoriserait la liaison des dimères avec l'ADN (Rutter *et al.*, 2001). Cet argument renforce la théorie de **l'implication de NPAS2** dans la machinerie moléculaire de l'horloge alimentaire.

7.2.2.1. KO *Npas*.

Les souris mutantes **NPAS2** ne présentent **pas d'altérations du rythme d'activité locomotrice** en LD. En DD, elles conservent une rythmicité circadienne dont la période est légèrement inférieure à celle des WT. Cependant, en LD comme en DD, leur patron d'activité est un peu différent et leur quantité d'activité légèrement supérieure à celle des WT (Dudley *et al.*, 2003). Les souris KO pour les gènes **NPAS1** et **NPAS3** ont été peu étudiées. Il semble que ces mutations n'aient **pas de conséquences du point de vue circadien**, mais plutôt du point de vue cognitif avec une implication possible dans l'étiologie des psychoses schizoéphrènes (Erbel-sieler *et al.*, 2004).

7.2.2.2. *Npas2*, un remplaçant possible pour *Clock*.

Pour établir si *Npas2* était effectivement le remplaçant possible de *Clock* dans les mécanismes de la FEO, l'activité locomotrice des **souris KO pour le gène *Npas2* soumises à une restriction alimentaire** a été mesurée (Dudley *et al.*, 2003). Les résultats indiquent que même si la **FAA ne disparaît pas** chez ces animaux, son **expression est retardée** par rapport à la souche sauvage. Les conclusions tirées par les auteurs sont cependant à considérer avec prudence puisque le protocole de **restriction alimentaire plutôt sévère** (seulement 4 heures d'accès à la nourriture), entraîne une perte de masse et une **mortalité** importantes chez les mutants. Les actogrammes révélant un délai dans l'apparition de la FAA, pourraient indiquer une absence totale de FAA dans le cadre d'une approche analytique différente, à laquelle il sera fait référence en discussion générale. Cependant, si l'on s'en tient à l'interprétation des auteurs il semblerait que **NPAS2 joue un rôle dans l'adaptabilité à la restriction alimentaire**. Il y aurait donc une modification de la machinerie moléculaire des SCN dans le FEO, s'appuyant non pas sur une boucle positive principale impliquant CLOCK et BMAL1, mais plutôt **NPAS2 et BMAL1**, l'implication de ce dernier restant cependant à démontrer.

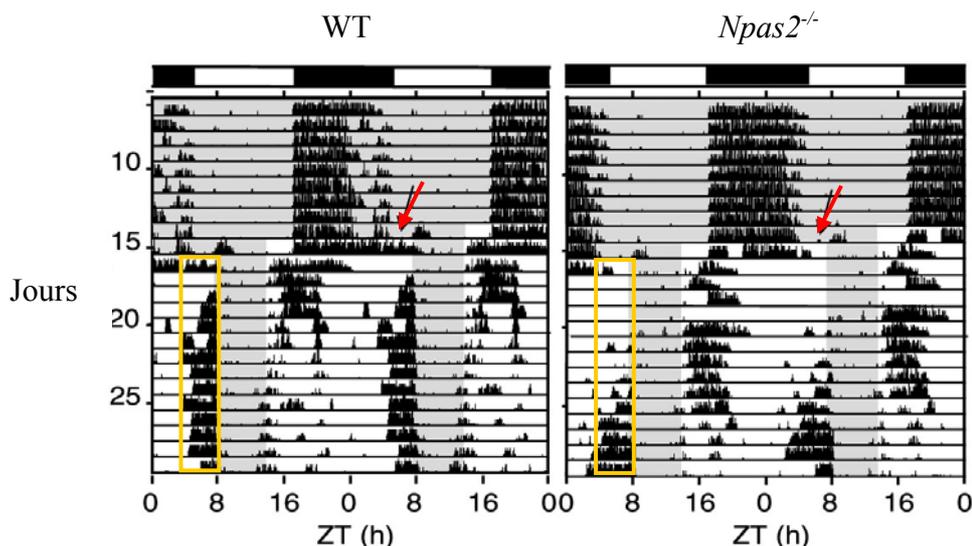


Figure 31 : Actogrammes en double représentation d'une souris sauvage (WT) et d'une souris mutante pour le gène *Npas2* (*Npas2*^{-/-}) en LD, puis en DD (début indiqué par la flèche rouge) soumises à une restriction alimentaire.

Le régime lumineux est indiqué au dessus de chaque actogramme. La zone grisée correspond à la période durant laquelle la nourriture est disponible. Les rectangles jaunes indiquent la FAA. Celle-ci est retardée chez les *Npas2*^{-/-}. Les jours sont reportés à gauche de chaque actogramme.

(Adapté de Dudley *et al.*, 2003).

7.2.3. *Cry*.

Comme mentionné en section II-4, **les gènes *Cry*** sont des composants essentiels de l'horloge suprachiasmatique. L'implication des gènes *Cry* a donc été testée concernant le comportement d'anticipation et le FEO (Iijima *et al.*, 2005). Comparées à des souris sauvages, **des souris *Cry1*^{-/-} / *Cry2*^{-/-}** expriment en LD une **FAA qui est moins stable et apparaît plus tard**. Il semblerait donc que les gènes *Cry* ne soient pas essentiels à la synchronisation par la nourriture en elle-même mais affecteraient plutôt la **stabilité et le développement de la FAA**, faisant ainsi partie intégrante du FEO. Cette étude intègre en complément une étude en **DD** afin de s'affranchir de l'influence de l'alternance du jour et de la nuit sur la synchronisation alimentaire, une sensibilité accrue à la lumière chez les mutants pouvant expliquer la diminution de la FAA. Or, les résultats indiquent que cela ne serait pas le cas ici. Enfin, l'expérience de synchronisation alimentaire est répétée chez des souris sauvages ou mutantes présentant des **lésions des SCN** afin de supprimer tout repère temporel éventuel qui permettrait un phénomène de mémoire sablier, en établissant une concordance entre l'heure du nycthémère et l'heure d'accès à la nourriture. Ici encore, la FAA semble moins nette et moins stable chez les mutants que chez les WT.

Un complément non négligeable apporté à cette étude est la mesure de **la persistance de la FAA** pour les deux génotypes lors d'un **jeûne** consécutif à la restriction alimentaire. La mesure est ici effectuée durant 2 jours de jeûne et 2 jours ad libitum suivant la restriction. La persistance de la FAA semble évidente pendant 4 jours chez les WT dans tous les cas, et pendant 4 jours, 2 jours et 1 jour en LD, DD et après lésion des SCN respectivement chez les mutants. Cela soulève le problème de **l'endogénéité du comportement** observé, mais cette

question n'est pas adressée par les auteurs. Les résultats peuvent également être discutés considérant la lisibilité limitée des actogrammes présentés dans ce travail ; il est probable que l'influence de la suppression de *Cry1* et *Cry2* soit plus importante que celle qui est dégagée dans cet article. On peut aussi regretter que, dans cette étude, il ne soit pas possible de distinguer les rôles respectifs de *Cry1* et *Cry2*, seuls les doubles mutants ayant été utilisés (Iijima *et al.*, 2005).

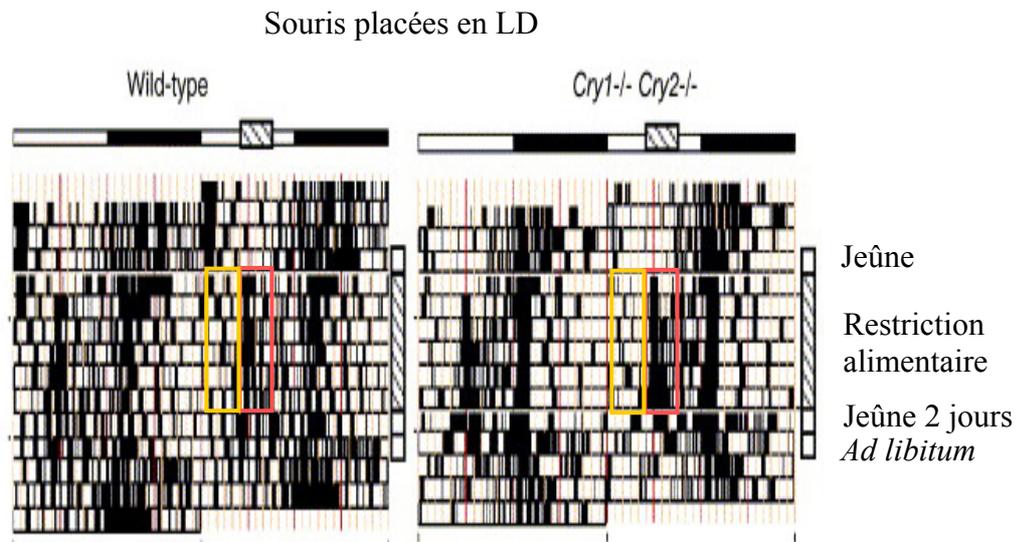


Figure 32 : Actogrammes en double représentation d'une souris sauvage (Wild type) et d'une souris mutante pour les gènes *Cry1* et *Cry2* (*Cry1^{-/-} /Cry2^{-/-}*) en LD, soumises à une restriction alimentaire. Le régime lumineux est indiqué au-dessus de chaque actogramme. Les rectangles jaunes et rouges indiquent la FAA et l'accès à la nourriture respectivement. La FAA est présente pour les animaux sauvages mais elle n'est pas évidente chez les mutants. Les auteurs concluent à un retard dans son apparition. La restriction est précédée et suivie d'un jeûne. Le jeûne précédant la RF démontre qu'il n'y a pas de FAA préexistante. Le jeûne post FAA doit démontrer la persistance de la FAA, mais celle-ci n'est pas nette, ce qui est probablement dû à un challenge énergétique trop important pour les souris.

(Adapté de Iijima *et al.*, 2005).

8. Une nouvelle horloge centrale : l'horloge alimentaire.

Depuis une trentaine d'années, les arguments en faveur de l'existence d'une **nouvelle horloge** s'accumulent : cet oscillateur alimentaire est capable de **recevoir** un certain nombre d'informations relatives à la disponibilité alimentaire de l'environnement.

Il **intègre** ces différents synchroniseurs lorsqu'ils sont présentés dans le **domaine circadien** uniquement. Cette intégration se traduit par des modifications comportementales (anticipation dans divers paramètres) et physiologiques (corticostérone, température). L'oscillateur **distribue** donc le message à des effecteurs ou à des sorties. Ces **modifications comportementales et physiologiques persistent** durant quelques jours en conditions *ad libitum* et réapparaissent à l'heure attendue lors d'un jeûne, plusieurs semaines ou mois après l'arrêt de la restriction alimentaire. Cet oscillateur est donc **auto-entretenu**. Il exprime des

périodes de transition dans l'adaptation à un nouvel horaire d'accès à la nourriture après un décalage horaire. Différents systèmes de neurotransmetteurs ont pu être impliqués dans son fonctionnement. Une mutation de certains gènes horloges modifie les sorties de cet oscillateur ; ces gènes entrent donc probablement dans la machinerie moléculaire sous tendant la rythmicité de l'oscillateur. Il peut donc **générer** des messages à caractère rythmique. Ces arguments démontrent que l'oscillateur alimentaire est bien une **nouvelle HORLOGE : L'HORLOGE ALIMENTAIRE** (Food entrainable Clock : FEC).

9. Localisation de l'horloge alimentaire.

Un pré requis à l'étude extensive d'une horloge putative est, bien entendu, la connaissance de la localisation de cette entité. Point faible de notre argumentation et frein à l'étude de la synchronisation alimentaire : malgré les récentes avancées dans le domaine, on ne connaît pas la localisation exacte de la FEC.

De nombreuses hypothèses ont été avancées quant au site de la FEC : une structure centrale unique, un organe périphérique unique, un système multi-oscillateur central. Les études présentées ici nous donnent quelques indications.

9.1. Système nerveux central vs périphérique.

Du fait que de nombreux **organes périphériques** comme les intestins, les reins ou le foie expriment des gènes horloges et peuvent être synchronisés par une restriction alimentaire (Damiola *et al.*, 2000 ; Hara *et al.*, 2001 ; Stokkan *et al.*, 2001), il était possible que certains tissus périphériques fassent partie intégrante de la FEC et, pourquoi pas, être eux-mêmes la FEC.

9.1.1. Le foie, le pancréas.

Des injections intrapéritonéales chroniques de **tétrachloride de carbone** (CCl₄) chez des rats altèrent considérablement la fonction hépatique suite à l'apparition **d'une cirrhose généralisée**, ce qui se traduit par des modifications de l'architecture cellulaire et de la physiologie du foie. Ce traitement ne change ni la rythmicité circadienne, ni la prise alimentaire ou la prise de poids. Lorsque les animaux traités sont soumis à une **restriction alimentaire, la FAA**, mesurée au moyen de la prise hydrique, ne semble **pas être modifiée** comparée aux rats contrôles, indiquant que le foie ne serait essentiel ni pour l'expression de la FAA, ni pour la synchronisation de la FEC par la nourriture (Escobar *et al.*, 2002). Cependant, dans ce protocole, il n'est pas possible d'exclure que certaines cellules intactes du foie puissent encore percevoir et redistribuer une information relative à la disponibilité alimentaire. La question reste donc ouverte.

Sachant que l'insuline est libérée dans la circulation générale durant un repas, il est possible que le pancréas soit à l'origine de signaux humoraux distribués à la fois au système nerveux central et aux tissus périphériques. Une injection de **streptozotocine** induit une destruction des cellules β produisant l'insuline dans les îlots de Langerhans, rendant les rats

immédiatement **diabétiques**. Ces animaux, soumis à une RF, présentent une **FAA identique à celle des rats contrôles** (Davidson *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces travaux indique que les signaux du foie et du pancréas ne seraient pas nécessaires à l'établissement de la FAA.

9.1.2. Le système digestif dans son ensemble.

Il faut ajouter à l'expérience décrite ci-dessus, celle réalisée sur des rats génétiquement modifiés chez lesquels le promoteur du gène *Per1* a été associé à un gène rapporteur codant pour la luciférase. Ces rats étaient entraînés pendant 10 jours à un accès à la nourriture durant le jour, puis à 10 jours en conditions *ad libitum*, et enfin étaient soumis à 2 jours de jeûne. Après quelques jours de nourrissage diurne, les animaux présentaient une **FAA** qui disparaissait en conditions *ad libitum* et réapparaissait durant le jeûne. Le **pic d'expression de *Per1*** était décalé de la période nocturne à la période **diurne dans le foie, l'estomac et le colon** durant un nourrissage diurne et durant le jeûne et redevenait nocturne en conditions *ad libitum* (Davidson *et al.*, 2003). En plus de présenter une FAA pour un nourrissage diurne, les animaux ont été entraînés à anticiper **deux repas** séparés de 12 heures. Les tissus du système digestif ne présentaient un **pic d'expression de *Per1*** ne correspondant qu'au **nourrissage nocturne**, alors que les animaux présentaient une FAA pour chacun des deux repas. Il semblerait donc que la FAA ne soit pas intégralement générée au moyen de sorties émanant du système gastro-intestinal. Ces organes n'abriteraient donc pas l'horloge alimentaire (Davidson *et al.*, 2003).

De plus, Miki et collaborateurs (2003) démontrent que les **signaux émanant de l'estomac** et du système digestif dans son ensemble ne sont **pas nécessaires à l'entraînement des SCN et des tissus périphériques par la nourriture** : en effet, une nutrition parentérale délivrée de jour uniquement décale l'expression des gènes horloges dans ces deux structures (Miki *et al.*, 2003). En outre une **vagotomie sub-diaphragmatique** ne supprime ni le pic anticipatoire de corticostérone (Moreira et Krieger, 1982), ni la FAA (Comperatore et Stephan, 1990) alors qu'elle supprime toutes les informations parasympathiques afférentes des tissus périphériques vers les noyaux du tractus solitaire et le tronc cérébral dorsal. De plus une **désafférentation** par injection intra-péritonéale de capsaïcine, combinée à des lésions des SCN **ne supprime pas la FAA** (Davidson et Stephan, 1998).

La genèse des comportements anticipatoires serait donc indépendante des signaux ascendants des viscères vers le système nerveux central. Au vu de ces résultats, il est probable que **la FEC se trouve dans le système nerveux central** et non dans un organe périphérique. Il n'en demeure pas moins que les organes périphériques puissent être des sorties de l'horloge alimentaire (par exemple les glandes surrénales dans la production du pic anticipatoire de corticostérone), ou même des senseurs transmettant des informations sur l'état métabolique général à la FEC.

9.2. Approche lésionnelle.

La première hypothèse concernant la localisation de la FEC a été que celle-ci se trouvait dans une structure centrale unique. L'approche logique pour déterminer ce site a été la même qu'avec les SCN : effectuer une lésion de la structure cible et s'assurer que cette lésion abolit le comportement contrôlé par cette structure, ici l'entraînement par une restriction alimentaire et l'expression d'une composante d'anticipation.

9.2.1. Bulbes olfactifs.

Parmi les propriétés de l'accès à la nourriture susceptibles d'entraîner les rythmes de la FEC, les **informations olfactives** pourraient avoir une influence. Afin d'éliminer l'olfaction comme facteur essentiel de l'entraînement alimentaire, des **bulbectomies** ont été réalisées chez le rat (Davidson *et al.*, 2001b). Lorsqu'ils sont soumis à une restriction alimentaire de 2 heures par jour, les animaux opérés présentent en quelques jours une **FAA** dans le comportement d'approche de la mangeoire, identique à celle observée chez les animaux contrôles. Cette **FAA persiste** en condition de jeûne. Les informations olfactives ne seraient donc pas nécessaires à l'établissement de la FAA (Davidson *et al.*, 2001b). De plus, s'il avait déjà été démontré que les bulbes olfactifs renferment une horloge centrale (Granados-Fuentes *et al.*, 2004 ; Granados-Fuentes *et al.*, 2006), il ne semble pas que cette horloge soit la FEC.

9.2.2. Structures hypothalamiques et thalamiques.

9.2.2.1. Hypothalamus ventromédial (VMH).

Les VMH sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et des comportements alimentaires (Pénicaud *et al.*, 1983). Une lésion des VMH a pour conséquence une hyperphagie. Les rythmes d'entraînement à une restriction alimentaire ont été testés chez des rats présentant des **lésions bilatérales des VMH**. Les résultats sont quelque peu contradictoires : des études datant d'une vingtaine d'années indiquent que des lésions électrolytiques des VMH **abolissent la FAA** (Inouye, 1982) ainsi que les pics anticipatoires de température et de corticostérone (Krieger, 1980). Des études plus récentes démontrent que 5 à 9 semaines après lésion, **les rats recouvraient la possibilité d'exprimer une FAA** (Mistlberger et Rechtschaffen 1984) ainsi qu'un pic anticipatoire de corticostérone (Honma *et al.*, 1987b). Ce dernier n'était apparent qu'après 8 à 10 semaines après lésion pour un accès à la nourriture de 4 heures par jour, mais il était observable dès 2 semaines après lésion lorsque l'accès à la nourriture était réduit à 1 heure par jour (Honma *et al.*, 1987b). La période de 8 semaines correspond au temps de stabilisation de la prise alimentaire chez les rats lésés. Challet et collaborateurs (1997) confirment ces résultats en effectuant à la fois des lésions électrolytiques et chimiques des VMH (acide iboténique). Contrairement aux lésions électrolytiques, les lésions chimiques n'endommagent pas les fibres de passage. Une atténuation générale de l'activité, y compris de la FAA, est constatée pour les deux types de lésions, qui est cependant moindre dans le groupe lésé à l'acide iboténique (Challet *et al.*, 1997b). Ce résultat confirme d'une part que **la FAA n'est pas abolie par une lésion des**

VMH, et indique d'autre part **l'importance des fibres de passage** dans les VMH. Ces expériences démontrent que les VMH ne seraient pas un composant essentiel de la FEC. Il est possible que les premiers résultats soient la conséquence d'un état métabolique instable dans les semaines qui suivent la lésion des VMH.

9.2.2.2. *L'aire hypothalamique latérale (LH).*

Tout comme les VMH, le LH est impliqué dans la régulation des comportements alimentaires. Une lésion du LH provoque, en miroir des VMH, une hypophagie. La **LH participe également à l'éveil** via le **système orexinergique** puisqu'il est très riche en neurones à orexines (Akiyama *et al.*, 2004). L'activité neuronale dans le LH est modulée par des stimuli pré et post prandiaux et pourrait donc véhiculer des informations sur l'heure des repas. De plus, une étude a identifié des rythmes dans l'activité multi-unitaire neuronale dans le LH d'animaux présentant des lésions des SCN (Kurumiya et Kawamura, 1985 cité par Mistlberger et Rusak 1988). De ce fait, il est possible qu'il participe à la genèse des signaux d'entraînement à la nourriture. Des **lésions à l'acide iboténique** de cette structure ont donc été réalisées. Durant 3 à 6 jours suivant les lésions, les rats ne s'alimentaient ni ne buvaient plus. Cependant, une croissance normale était évidente au delà. Six semaines après la chirurgie, les animaux étaient soumis à une RF de 2 heures par jour. **La FAA était évidente** en quelques jours chez la plupart des animaux, et **persistait en condition de jeûne**, à la fois dans l'activité et le comportement d'approche de la mangeoire (Mistlberger et Rusak, 1988). Il semblerait donc que **la LH ne soit pas un composant essentiel de la FEC**. Par contre, les neurones à orexines, en grand nombre dans cette structure, pourraient jouer un rôle dans l'éveil lors de la FAA. Dans ce cas, il faudra considérer d'autres structures possédant des neurones à orexine (l'aire périfornicale par exemple) comme sorties de la FEC, ou éventuellement comme l'un de ses composants.

9.2.2.3. *Noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN).*

Tout comme le LH, les PVN reçoivent des informations relatives à la prise alimentaire. Ils sont en outre reliés aux systèmes neuroendocrine et autonome, et peuvent à ce titre moduler des processus physiologiques en relation avec la prise alimentaire. Il est donc possible qu'ils participent aux mécanismes de la FEC. De **larges lésions à radiofréquence dirigées vers les PVN** et endommageant par la même occasion partiellement SCN, noyaux périventriculaires, aire préoptique médiale, hypothalamus dorsomédial (DMH) et VMH, ont été réalisées chez le rat. Les animaux lésés présentent un **patron d'activité normale** avant la restriction. Lorsqu'ils sont soumis à une restriction de l'accès à la nourriture à 2 heures par jour, la plupart des rats lésés présentent **une FAA dans l'approche de la mangeoire**, mais celle-ci est **atténuée pour l'activité locomotrice de roue**. Chez 3 rats présentant des lésions complètes, la FAA disparaît complètement pour l'activité locomotrice, mais persiste dans l'approche de la mangeoire. Ces caractéristiques persistent lors d'un jeûne (Mistlberger et Rusak, 1988).

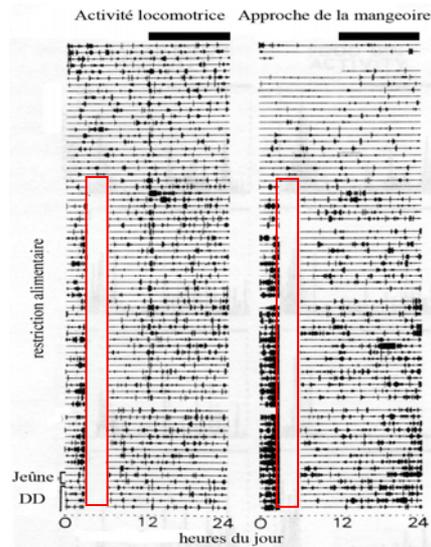


Figure 33 : Diminution de la FAA suivant une lésion des PVN.

Les actogrammes représentent l'activité locomotrice (gauche) et l'approche de la mangeoire (droite) pour des rats présentant des lésions des PVN débordant sur les SCN. Les animaux sont donc arythmiques. Ils anticipent parfaitement l'accès à la nourriture (rectangles rouges) dans le comportement d'approche de la mangeoire alors que la FAA est quasiment absente dans l'activité locomotrice. À la fin de l'expérience, les animaux sont soumis à 72 heures de jeûne, puis sont placés en DD. Le cycle LD est représenté en haut de chaque actogramme.

(Adapté de Mistlberger et Rusak, 1988).

Cette expérience démontre qu'il est possible de **dissocier les sorties de la FEC**. De plus, elle indique l'implication probable des PVN dans l'expression de la FAA mesurée par l'activité de roue. Ils pourraient donc être l'un des chemins de sortie de la FEC.

9.2.2.4. Noyau arqué (Arc).

Une étude systématique de l'apparition de la FAA chez des animaux SCN lésés a révélé que dans le cadre de **lésions débordant sur l'Arc**, l'anticipation était moins nette, voire absente. Le noyau arqué envoie des projections à NPY vers plusieurs noyaux hypothalamiques intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire. De plus, le NPY a été impliqué dans la régulation de l'alimentation : il est un puissant orexigène. Une administration de **glutamate monosodium** dans les jours qui suivent la naissance de rats induit des **dégâts irréversibles dans l'Arc** (cellules à NPY). Cette injection a les mêmes conséquences qu'une **lésion électrolytique de l'Arc** (hypophagie, dérèglements hormonaux et problèmes de croissance, atténuation du rythme de prise alimentaire ; Mistlberger et Antle, 1999). Par contre, même si les dommages semblent importants, lorsque les rats sont soumis à 4 heures d'accès quotidien à la nourriture de jour, une **FAA tout à fait normale** se développe en 5 à 7 jours. Elle semble même plus longue que celle observée chez des rats témoins. Notons que cette FAA est mesurée, non pas grâce à l'activité locomotrice, mais au moyen du comportement d'approche de la mangeoire. Cette **FAA persiste** durant 3 jours consécutifs de jeûne.

9.2.2.5. Noyaux hypothalamiques dorsomédiaux (DMH).

Les DMH sont interconnectés avec l'ensemble des noyaux hypothalamiques et reçoivent à la fois des informations humorales et neuronales de voies impliquées dans la prise alimentaire et la balance énergétique. C'est donc un bon candidat pour abriter la FEC ou l'un de ses composants. Deux études publiées consécutivement ont impliqué ces noyaux dans les mécanismes de synchronisation alimentaire.

Des **lésions à l'acide iboténique des DMH** ont été réalisées chez des rats qui ont ensuite été soumis à une RF (3 heures par jour). Une **diminution de la FAA** est observée aussi bien dans l'activité générale que dans la température (mesures télémétriques) et l'éveil (électro-encéphalographie). Cependant il faut noter que les animaux lésés présentent une **diminution drastique de leur activité générale**, même en condition de nourriture *ad libitum*. Il est néanmoins très net que l'anticipation de la température et l'éveil sont fortement diminués (Gooley *et al.*, 2006). Malgré ces résultats prometteurs, les auteurs concluent prudemment que les DMH peuvent être la FEC mais également l'une de ses entrées ou sorties.

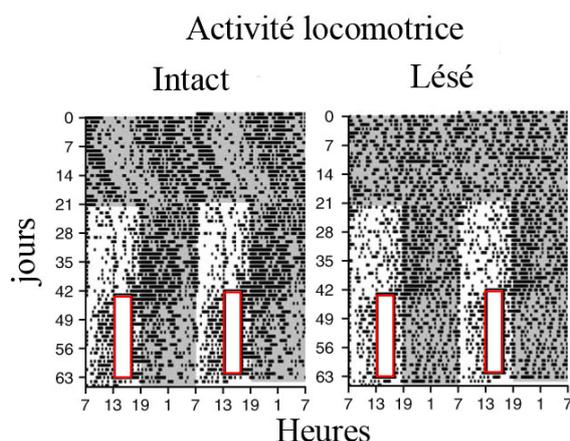


Figure 34 : Diminution de la FAA suivant une lésion des DMH.

Actogrammes en double représentation correspondant à l'activité locomotrice chez un rat intact (gauche) ou ayant subi des lésions des DMH (droite) à l'acide iboténique. Les rats intacts anticipent parfaitement l'accès à la nourriture (rectangles rouges). Les animaux lésés sont quasiment arythmiques en DD (première partie de l'actogramme), leur activité générale diminue et la FAA est moins importante que chez les contrôles. Le fond gris correspond à la nuit et le fond blanc au jour.

(Adapté de Gooley *et al.*, 2006).

Parallèlement, une approche originale a indiqué que **les DMH abritent un oscillateur entraîné par la nourriture**. En effet, ils présentent une **expression rythmique des gènes *Per1* et *Per2* uniquement lorsque les souris sont soumises à une RF** (4 heures d'accès). Même si l'amplitude de ce rythme est un peu réduite lors d'un jeûne, elle persiste durant plusieurs jours dans ces conditions (Mieda *et al.*, 2006). Le fait qu'une expression rythmique *de novo* soit observable dans les DMH en RF n'indique malheureusement pas que cette structure abrite la FEC, mais il démontre que les DMH sont entraînés par la nourriture. Ce résultat renforce cependant le précédent. Enfin, une troisième étude a donné des résultats opposés à ceux publiés par Gooley et collaborateurs (2006) : en effet des **lésions par**

radiofréquences des DMH ont pour effet de diminuer l'activité générale des rats, mais **la FAA ne semble quasiment pas affectée** par cette lésion. En outre, elle persiste plusieurs jours lorsque la nourriture est de nouveau fournie *ad libitum* et réapparaît lors d'un jeûne (Landry *et al.*, 2006).

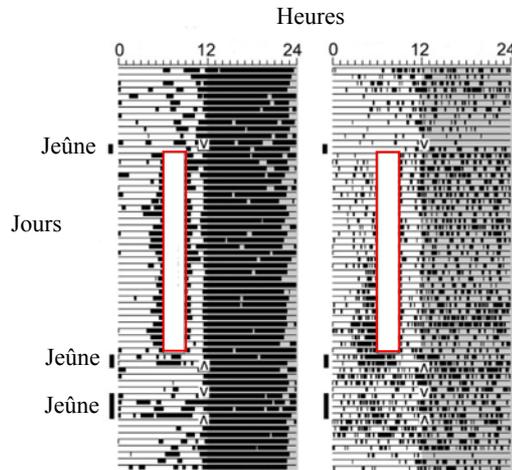


Figure 35 : la FAA suivant une lésion des DMH.

Les actogrammes représentent l'activité locomotrice chez un rat intact (gauche) ou ayant subi des lésions des DMH (droite) par radiofréquences. Les rats intacts anticipent parfaitement l'accès à la nourriture (rectangles rouges). Les animaux lésés ont une activité générale diminuée mais la FAA est toujours présente. Elle persiste lors d'un jeûne. Le fond gris correspond à la nuit et le fond blanc au jour.

(Adapté de Landry *et al.*, 2006).

Ces résultats contradictoires laissent ouverte la question du rôle des DMH dans la FEC. Ils peuvent être la conséquence des deux types de lésions utilisées.

9.2.2.6. Noyau paraventriculaire thalamique (PVT).

Le PVT reçoit des afférences de régions du tronc cérébral et de l'hypothalamus impliquées dans la prise alimentaire et l'éveil. Il envoie des projections vers les régions limbiques, corticales et hypothalamiques. Une **lésion par radiofréquences des PVT** augmente le niveau moyen de l'activité générale chez le rat nourri *ad libitum*, mais **n'altère pas la FAA**, mesurée par le comportement d'approche de la mangeoire (Landry *et al.*, 2007). Les PVT ne semblent donc pas abriter la FEC.

9.2.3. Système limbique.

Outre la composante purement énergétique de la prise alimentaire, il est possible qu'une **composante motivationnelle** soit le déclencheur de la FAA lorsque l'accès à la nourriture est limité dans le temps. Dans ce cas, les structures limbiques pourraient abriter l'horloge alimentaire. L'hypothèse selon laquelle la FAA pourrait être partiellement ou totalement un phénomène de mémoire a également été avancée.

Dans une approche lésionnelle, de larges lésions combinées englobant soit l'**hippocampe** (aspiration + lésion électrolytique), soit le **noyau accumbens** et la partie du télencéphale médian antérieure au thalamus (lésions par radiofréquences), ont été réalisées.

L'activité locomotrice et le comportement d'approche de la mangeoire de ces rats ont ensuite été enregistrés en conditions de nourriture *ad libitum* ou lors d'une restriction alimentaire de 2 heures par jour. Si les rythmes en libre cours semblent perturbés dans certains cas par une lésion de l'hippocampe, il n'en est pas de même **pour la FAA qui s'exprime normalement** pour toutes les lésions. Elle persiste en conditions de jeûne (Mistlberger et Mumby, 1992).

L'hippocampe est une structure dédiée à l'apprentissage et à la mémoire au sens large, qui pourraient englober des mécanismes d'apprentissage de l'heure des repas. Or, les auteurs démontrent dans cette expérience que les lésions de l'hippocampe n'empêchent pas les animaux « d'apprendre » l'heure d'accès des repas ou la FAA de se développer. **La composante mnésique n'est donc pas essentielle au fonctionnement de la FEC.** Le **noyau accumbens** est considéré comme l'interface entre les systèmes limbique et moteur et il est activé en relation avec des processus motivationnels (Mogenson *et al.*, 1980). Cependant, une fois encore, des lésions larges touchant ce noyau n'empêchent pas la FAA d'apparaître et de persister, y compris lors d'un jeûne (Mistlberger et Mumby, 1992). La composante motivationnelle ne serait donc pas nécessaire à l'entraînement par la nourriture et à l'expression de la FAA. Etant donné que dans cette expérience la quasi totalité des efférences depuis l'amygdale ont été détruites (BNST, septum, noyau accumbens) et parfois même l'amygdale elle-même, les auteurs concluent que le **complexe amygdalien n'est pas un composant de la FEC** (Mistlberger et Mumby, 1992).

Une autre expérience a utilisé des **lésions excitotoxiques du noyau accumbens**, localisées au niveau de la « coquille (*shell*) » ou du « centre (*core*) » de cette structure. Une lésion du *shell* induit une augmentation de la prise alimentaire et du poids des rats, alors qu'une lésion du *core* a l'effet inverse (Mendoza *et al.*, 2005b). Lors d'une RF, une FAA normale se développe chez les rats *shell* lésés, mais **la FAA est réduite par des lésions du core**. De plus, l'immunoréactivité pour c-FOS augmente en anticipation du nourrissage dans le *core* et durant le repas dans le *shell* indiquant que ce dernier serait plutôt impliqué dans le comportement de consommation de nourriture. Ces **profils ne sont conservés en conditions de jeûne que dans le core**, indiquant la présence d'un **oscillateur** dans cette zone, mais pas dans le *shell* (Mendoza *et al.*, 2005b). *Core* et *shell* ont une connectivité efférente différente, le premier ayant plutôt des projections vers le système moteur, et le second vers le système limbique. Ces projections différentes peuvent être à l'origine des différences observées lors de la lésion des subdivisions du noyau accumbens.

Il n'en demeure pas moins qu'une lésion du *core* diminue la FAA. Il est cependant difficile de conclure sur cette expérience : la diminution de la FAA peut signifier que le *core* se trouve sur un **chemin afférent ou efférent** de la FEC. C'est cette seconde hypothèse qui est privilégiée par les auteurs (Mendoza *et al.*, 2005b). Cependant, si la FEC n'est pas une structure unique, la diminution de la FAA peut signifier que **le core du noyau accumbens peut être l'un des éléments de la FEC**. Dans cette expérience, seule l'activité locomotrice a été testée pour la

FAA. D'autres paramètres (corticostérone, température) permettraient de trancher sur la question : si toutes les sorties sont affectées également, cela signifie que le *core* est partie intégrante de la FEC. Si ce n'est pas le cas, il est probablement sur le chemin de sortie de celle-ci et contrôle l'activité locomotrice.

9.3. Tronc cérébral

Si le télencéphale a été souvent ciblé dans les approches lésionnelles, le tronc cérébral a, quant à lui été un peu délaissé. Le **noyau de tractus solitaire** (NTS) reçoit des informations des intestins. Non loin, l'**area postrema** (AP) ne possède pas de barrière hémato-encéphalique ce qui permet à des signaux sanguins d'agir sur le système nerveux central. Le **noyau parabrachial** (NPB) est également localisé dans le tronc cérébral et reçoit des projections du NTS et de l'AP. Une **lésion de l'AP par cautérisation ne supprime pas la FAA** (approche de la mangeoire) chez des rats soumis à 2 heures d'accès à la nourriture (Davidson *et al.*, 2001a). Il est donc probable que l'AP ne véhicule pas les informations métaboliques sanguines vers la FEC.

Par contre, des **lésions** électrolytiques ou par injection d'acide iboténique du **NPB diminuent considérablement la FAA** dans le comportement d'approche de la mangeoire et abolit le pic anticipatoire de température, comparé à des rats contrôles. En dehors de la FAA, ces paramètres ne sont pas modifiés par la lésion. En outre, les rats lésés ne perdent pas plus de poids que les rats contrôles, indiquant que la prise alimentaire serait comparable (Davidson *et al.*, 2000).

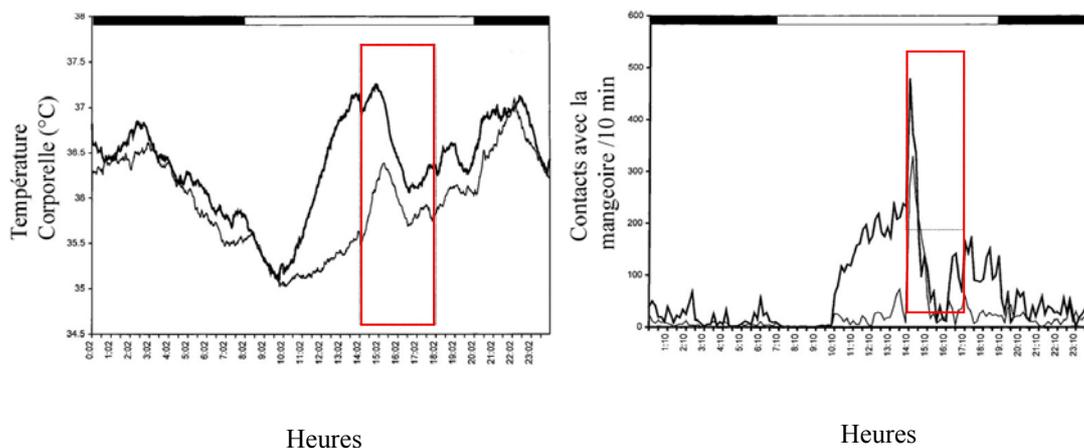


Figure 36 : Diminution de la FAA suivant une lésion du noyau parabrachial.

Les courbes représentent les valeurs de température corporelle (gauche) et d'approches de la mangeoire par 10 minutes (droite) moyennées sur 3 jours consécutifs. Les animaux intacts (courbes noires) anticipent parfaitement l'accès à la nourriture (rectangles rouges) alors que la FAA est quasiment absente chez les animaux lésés (courbes grises). Le cycle LD est représenté en haut de chaque courbe.

(Adapté de Davidson et al., 2000).

Dans cette expérience, on peut déplorer le petit nombre d'animaux correctement lésés qui ont été utilisés. Ce résultat reste néanmoins spectaculaire puisque c'est la seule lésion décrite

jusqu'ici capable d'altérer la FAA à la fois pour un paramètre physiologique (température) et comportemental (approche de la mangeoire). Il peut signifier soit que le NPB renferme la FEC, soit qu'il est une entrée ou une sortie essentielle de cette horloge.

9.3.1. Influence sur une seule sortie.

Il a déjà été démontré qu'une lésion des PVN diminuait la FAA mesurée au moyen de l'activité de roue, mais pas au niveau du comportement d'approche de la mangeoire. Des résultats similaires ont été obtenus en effectuant des lésions d'autres structures centrales.

9.3.1.1. Hypophyse.

Les liens entre rythmes circadiens et fonction pituitaire sont bien établis : les rythmes des hormones sexuelles chez la femelle sont par exemple contrôlés par l'hypothalamus. De plus, les cycles œstriens sont perturbés par une lésion des SCN, de même que les rythmes de sécrétion de corticostérone. Etant donnée l'importance de **l'hypophyse** dans la transmission de ces rythmes, et le fait que des hormones comme la corticostérone sont entraînées par une RF, il est possible qu'elle joue un rôle dans la synchronisation alimentaire. Des **rats hypophysectomisés et soumis à une RF** anticipent parfaitement un accès quotidien de 4 heures à la nourriture pour le comportement d'approche de la mangeoire. Une lésion des SCN n'altère pas ce comportement. Après un décalage de 8 heures de l'accès à la nourriture, la FAA est entraînée en quelques jours au nouvel accès (Davidson et Stephan, 1999). Par contre, **la température corporelle**, significativement plus basse chez les animaux hypophysectomisés, **ne présente pas l'augmentation habituelle en anticipation (FAT)**. Il est probable que l'hypophyse se trouve sur le **chemin de sortie de la FEC** et participe à la genèse de la FAT. Cependant, les auteurs soulignent que les rats hypophysectomisés étant plus petits en taille, ils ne peuvent stocker suffisamment d'énergie pour produire une élévation de température (Davidson et Stephan, 1999). Cette hypothèse serait supportée par le fait que la température de ces rats augmente consécutivement à l'accès à la nourriture. Ceci dit, des rats et des souris soumis à une restriction calorique présentent une FAT en dépit d'une déplétion évidente en énergie. Il est donc également possible que l'effet sur la FAT ne soit pas spécifique d'une perte de fonction sur un chemin de sortie de la FEC, mais d'un état hypothermique général chez l'animal.

9.3.1.2. Cortex infralimbique.

Le cortex préfrontal médial a été impliqué dans la préparation et la coordination des messages du système nerveux autonome. Le **cortex infralimbique** est l'une des subdivisions du cortex préfrontal médial. Il est considéré comme une aire autonome corticale. Une **lésion à l'acide iboténique** de cette structure a pour conséquence une **disparition à la fois de la FAT et de la hausse de température post-prandiale (DIT)**. Tout comme dans le cadre d'une lésion de l'hypophyse, la température corporelle moyenne des rats ayant subi une lésion du cortex infralimbique est inférieure à celle des rats contrôles (Recabarren *et al.*, 2005). Une fois de plus, cette expérience démontre que les sorties de la FEC peuvent être dissociées. Les rats

ayant des lésions du cortex infralimbique étant à priori moins affectés que ceux ayant subi une hypophysectomie, il est plus probable que cette aire soit sur le même trajet de sortie de la FEC que l'hypophyse. Cela dit, il est possible que ces deux structures fassent partie d'un même réseau contrôlant la réponse thermique de la FEC.

9.4. Autres structures.

D'autres structures, éliminées en général comme régions adjacentes d'autres structures visées, ont ainsi été identifiées comme n'interférant pas avec la FAA : les cortex orbital et pédonculaire dorsal, le gyrus cingulaire, le septum médial et latéral, la zone verticale de la bande diagonale, le pallidum, le noyau du lit de la strie terminale, le noyau caudé, le feuillet inter-géniculé, le néocortex (Mistlberger, 1994 pour revue). Ces structures ne seront pas détaillées plus avant.

9.5. Un réseau de plusieurs structures.

Considérant les résultats contradictoires obtenus lors de lésions d'une seule structure cérébrale, un nombre croissant d'études postulent que la FEC ne résiderait pas dans une structure unique mais que son activité résulterait de **l'influence combinée de plusieurs oscillateurs centraux ayant une fonction partiellement redondante**. De nouvelles approches s'avèrent nécessaires pour rechercher des systèmes multi-oscillateurs. L'une de ces approches a été utilisée par Mieda et collaborateurs (2006) et consiste à rechercher une **expression rythmique de novo d'un gène horloge en réponse à une RF**. Elle a permis d'identifier les DMH comme FEC putative.

Une autre possibilité est de rechercher **quelles structures sont activées durant la FAA**, formulant l'hypothèse qu'une structure contrôlant la FAA doit être active avant ou durant la FAA. Cette approche est illustrée dans des études où **l'expression de c-FOS** a été mesurée en anticipation de la prise alimentaire lors d'une RF. Ainsi, dans la LH, l'aire périfornicale et les DMH, l'immunoréactivité pour c-FOS augmente avant l'accès à la nourriture. Ce pic réapparaît à l'heure attendue lors d'un jeûne (Angeles-Castellanos *et al.*, 2004). Une autre étude décrit en outre une activation transitoire du noyau tubéromammillaire en anticipation de l'heure du repas (Inzunza *et al.*, 2000). Chez des rats entraînés à une RF, un pic de c-FOS est également observé dans le noyau accumbens, l'amygdale centrale et basolatérale, le noyau du lit de la strie terminale, le septum latéral, le cortex préfrontal et les PVT, à la fois en anticipation et durant l'accès à la nourriture (Angeles-Castellanos *et al.*, 2007). De plus, **le rythme de la protéine PER1** est décalé vers l'heure du repas lors d'une RF. Son pic d'expression suit l'accès à la nourriture dans le noyau accumbens, le noyau du lit de la strie terminale, l'hippocampe, l'amygdale centrale, le septum latéral et l'aire périfornicale. Le rythme est amplifié dans les PVT et l'amygdale baso-latérale (Angeles-Castellanos *et al.*, 2007). La modification du rythme d'une protéine horloge indique que **ces structures sont sensibles à l'information alimentaire** et pourraient donc participer aux mécanismes de l'horloge alimentaire. Ces études démontrent ainsi l'implication possible des structures

cortico-limbiques et hypothalamiques dans l'anticipation de l'heure du repas et la synchronisation alimentaire.

Concernant le **tronc cérébral**, centre de relais pour la communication entre tissus périphériques et structures centrales, il semble que la synthèse de **c-FOS augmente après l'accès à la nourriture** dans un certain nombre de structures (NPB, NTS, AP, noyau moteur dorsal du nerf vague) qui ne persiste pas lors d'un jeûne. Cette augmentation de c-FOS dans ces structures est donc **directement dépendante de la prise alimentaire**. Elles ne sont donc probablement pas à l'origine de la génération de rythmes liés à la prise alimentaire et n'abritent probablement pas la FEC (Angeles-Castellanos *et al.*, 2005).

Ensemble, ces études démontrent la **complexité de la FEC**. Le fait qu'aucune lésion unique n'a clairement engendré à ce jour la disparition des rythmes liés à la prise alimentaire indiquerait qu'elle réside dans un réseau de structures oscillantes. Cependant, une approche utilisant l'activation neuronale (c-FOS) ne peut permettre d'identifier ce réseau, le marquage n'étant pas spécifique : comment alors distinguer une structure, ou un réseau de structures générant des oscillations des sorties de ce réseau, contrôlant le comportement et la physiologie de l'animal ? En effet, ces données ne permettent pas d'établir une hiérarchie entre les différentes structures.

La FEC reste donc un mystère : une structure unique que toutes les études lésionnelles auraient jusqu'ici épargnée ou un réseau de structures oscillantes ayant des fonctions redondantes. La question reste ouverte et de nouvelles approches sont nécessaires à l'identification du substrat anatomique de cette nouvelle horloge centrale.

CHAPITRE 2
OBJECTIFS DE MON
TRAVAIL DE THÈSE

Horloges ou oscillateurs, tous sont soumis à l'influence de synchroniseurs, véhiculant des informations temporelles. Ceux-ci régulent la phase ou l'amplitude du rythme exprimé. Pour une horloge, le(s) synchroniseur(s) permet(tent) la remise à l'heure quotidienne et la mise en adéquation des rythmes circadiens (environ 24 heures) avec les rythmes astronomiques (exactement 24 heures). Pour un oscillateur, la récurrence du synchroniseur est essentielle au maintien du rythme et prévient son atténuation.

Nous avons vu en première partie de l'introduction que les SCN peuvent répondre à différents types de synchroniseurs : la lumière (ou synchroniseur photique) véhicule l'information dominante de mise à l'heure pour cette horloge. Cependant, des synchroniseurs non photiques, comme une application pharmacologique quotidienne de mélatonine ou une restriction de l'accès à la nourriture, peuvent également influencer sur l'horloge principale. Pour l'horloge alimentaire, l'information essentielle et dominante pour la synchronisation est véhiculée par l'occurrence sur une base circadienne du ou des repas, bien que des informations pharmacologiques (méthamphétamine) puissent également influencer cette horloge.

Les oscillateurs périphériques sont en général considérés comme « esclaves » des SCN en ce sens que la phase d'expression des gènes horloges dans la plupart de ces tissus semble imposée par les SCN. Pourtant, alors que la phase d'expression des gènes horloges dans les SCN n'est pas affectée par une inversion de la disponibilité alimentaire (accès durant le jour chez les espèces nocturnes), les rythmes d'expression des gènes horloges sont inversés dans les tissus périphériques dans ces conditions. Le synchroniseur dominant pour les tissus périphériques serait donc l'information métabolique (alimentaire).

A la lumière de ces résultats, il semblerait que tous les tissus puissent être synchronisés par des informations métaboliques et alimentaires, alors que tous ne sont pas directement sensibles à la synchronisation photique. Cette constatation nous a amenés à nous interroger sur le caractère multi-oscillant de la synchronisation alimentaire.

Comment l'information temporelle véhiculée par la nourriture est-elle interprétée par les différents tissus ?

Quels acteurs moléculaires sont-ils impliqués dans cette synchronisation aux niveaux central et périphérique ?

Quelles structures, centrales ou périphériques, sont-elles à l'origine des réponses comportementales à une restriction alimentaire ?

Afin d'apporter des réponses à ces questions, mon travail de thèse a été axé sur la compréhension des mécanismes sous tendant la synchronisation alimentaire, par l'étude de l'expression des gènes horloges dans diverses structures cérébrales et périphériques en réponse à une restriction alimentaire. A cette approche moléculaire, nous avons ajouté des études fonctionnelles dans le système nerveux central ainsi que des expériences d'ablation

chirurgicale. Ces approches moléculaires et physiologiques combinées au suivi comportemental des animaux doit apporter une meilleure connaissance des mécanismes et du substrat neuroanatomique sous-tendant la synchronisation alimentaire.

CHAPITRE 3
RESULTATS

I. Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output.

L'horloge circadienne principale, les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, peut être remise à l'heure quotidiennement soit par l'alternance du jour et de la nuit (cycle LD) soit par des facteurs non photiques, tels que l'application pharmacologique de mélatonine ou une restriction calorique. Jusqu'ici, les relations de phase entre les acteurs des oscillations circadiennes et le comportement n'ont été étudiés que chez des animaux synchronisés au cycle LD ou en conditions constantes d'éclairement.

Dans l'article qui va suivre, nous avons mis en place des expériences nous permettant de déterminer si l'organisation temporelle de l'horloge moléculaire est altérée par des synchroniseurs non photiques. Nous avons mesuré l'expression des gènes horloges (*Per1*, *Per2*, *Bmal1*) et des gènes contrôlés par l'horloge (AVP), chez des rats synchronisés par la lumière ou placés en obscurité constante et synchronisés par la mélatonine ou la nourriture. La phase d'expression des gènes horloges a ensuite été comparée à celle de l'activité locomotrice, mesurée par actimétrie.

Dans les SCN d'animaux synchronisés à un cycle LD, les pics d'expression de *Per1* et *Per2* surviennent durant le jour, c'est à dire durant la phase de repos d'un rongeur nocturne, et le pic d'expression de *Bmal1* apparaît durant la nuit (phase d'activité de l'animal nocturne).

Chez des rats en obscurité constante, les rythmes d'activité locomotrice peuvent être synchronisés par un créneau lumineux quotidien de 1 heure. Ce créneau est interprété comme le début du jour, comme démontré par l'arrêt de l'activité locomotrice après celui-ci. Une perfusion sous cutanée quotidienne de mélatonine (hormone normalement sécrétée uniquement la nuit) peut également synchroniser les rythmes d'activité locomotrice. Dans ce cas, le début de la perfusion coïncide avec le début de la nuit et l'activité commence au début de la perfusion quotidienne.

L'analyse de l'expression des gènes horloges dans les SCN confirme cette interprétation puisque, dans les deux cas, le pic d'expression de *Bmal1* (« gène de nuit ») coïncide avec la phase d'activité locomotrice.

Par contre, la synchronisation par un nourrissage hypocalorique modifie profondément l'organisation de l'activité locomotrice par rapport aux informations de l'horloge moléculaire. La phase d'activité locomotrice se trouve ainsi en phase avec les pics d'expression de *Per1* et *Per2* (« gènes de jour »). Cela indiquerait que la restriction calorique inverse la relation de phase entre l'horloge des SCN et la sortie comportementale, c'est-à-dire que les rats, habituellement nocturnes, deviennent actifs durant le jour subjectif.

Dans le cortex piriforme, structure du système nerveux central exprimant des gènes horloges mais n'abritant pas une horloge, le pic d'expression de *Per2* survient entre le début et le milieu de la phase l'activité (mélatonine et synchronisation à la lumière) ou de l'accès à la

nourriture. Sachant qu'en conditions de nourriture *ad libitum* les rats mangent majoritairement durant la phase nocturne du nyctémère, il semble ici que le pic d'expression de *Per2* dans le cortex piriforme coïncide toujours avec la prise alimentaire.

Ces expériences démontrent que tous les synchroniseurs non photiques ne sont pas équivalents, ni dans leurs effets sur l'horloge principale, ni pour l'interprétation des signaux de sortie émis par les SCN. Il est possible que la restriction calorique agisse en aval des boucles moléculaires des SCN pour générer une organisation comportementale temporelle opposée à celle du synchroniseur photique et de la mélatonine exogène.

Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output

Ivette CALDELAS, Céline A. FEILLET, Hugues DARDENTE, Françoise ECLANCHER, André MALAN, Sylviane GOURMELEN, Paul PEVET and Étienne CHALLET

European journal of neuroscience, 2005, Vol. 22, Pages 921-929

Blackwell Synergy® is a Blackwell Publishing, Inc. registered trademark

Copyright © 2005, Published on behalf of the Federation of European Neuroscience Societies

Pages 99-107 :

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/10.1111/j.1460-9568.2005.04284.x>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

II. Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food anticipatory activity.

Nous savons qu'après ablation chirurgicale des SCN les animaux deviennent arythmiques et ne sont plus capables de se synchroniser à l'alternance du jour et de la nuit. Cependant les animaux peuvent encore répondre à des synchroniseurs non photiques, comme l'heure d'accès à la nourriture. Il est ainsi possible de synchroniser plusieurs rythmes circadiens par une restriction alimentaire. Les rats précédemment arythmiques présentent alors une FAA observable dans de multiples paramètres physiologiques et comportementaux. Le contrôle de la synchronisation alimentaire, et donc de la composante d'anticipation repose sur l'horloge alimentaire, structure cérébrale dont la localisation reste inconnue à ce jour.

L'approche lésionnelle ayant jusqu'ici échoué dans la recherche du substrat anatomique sous-tendant la synchronisation alimentaire, nous avons cherché une approche nouvelle.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une structure impliquée dans la synchronisation alimentaire aurait une activité modifiée durant la FAA, et donc que sa consommation de glucose serait modifiée à ce temps horaire en condition de restriction alimentaire par rapport à une condition de nourriture disponible *ad libitum*.

Nous avons donc analysé l'influence d'une restriction temporelle et d'une restriction calorique sur les variations d'activité métabolique locale, mesurées dans un grand nombre de structures cérébrales, grâce à la technique du 2-DésoxyGlucose, en comparaison avec une condition de nourriture *ad libitum*, chez le rat. Les deux conditions de restriction devaient nous permettre de différencier les structures impliquées dans la synchronisation alimentaire en elle-même (restriction temporelle, sans déplétion d'énergie) par rapport aux structures impliquées dans la réponse à une déplétion en énergie (restriction calorique).

Nous avons ainsi démontré que le noyau paraventriculaire thalamique ne répond qu'à une restriction temporelle. La consommation locale de glucose dans les feuillets intergénéculés, les noyaux arqués et les noyaux paraventriculaires hypothalamiques ne varie qu'en condition de restriction calorique. L'aire préoptique médiale, le cervelet et le noyau du tractus solitaire répondent aux deux types de restriction.

Ces travaux soulignent la complexité du réseau sous-tendant la synchronisation alimentaire et révèlent des structures qui devront être privilégiées dans la recherche de l'horloge alimentaire.

Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food-anticipatory activity

A. PEREIRA DE VASCONCELOS, I. BARTOL-MUNIER, C.A. FEILLET, S. GOURMELEN, P. PEVET and E. CHALLET

Neuroscience, 2006, Vol. 139, Pages 741-748

Copyright © 2006 IBRO Published by Elsevier Ltd.

Pages 109-116 :

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.2005.12.045>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III. Restricted feeding in SCN-lesioned rats restores daily rhythms not only of locomotor activity but also of pineal melatonin: role of corticosterone?

Même si une lésion des SCN chez le rat a pour conséquence une arythmie immédiate dans nombre de paramètres, elle n'empêche pas la synchronisation des animaux par une restriction temporelle de l'accès à la nourriture (RF). Cette synchronisation se manifeste notamment dans l'activité locomotrice (FAA) et la sécrétion de corticostérone, qui augmentent dans les heures précédant l'accès à la nourriture. Ces phénomènes sont sous contrôle de la FEC.

Le système nerveux sympathique (SNS) est à la fois impliqué dans le contrôle du pic anticipatoire de corticostérone (FAC) par la FEC, dans le contrôle de la sécrétion de mélatonine par les SCN et peut être influencé par l'activité locomotrice. Ce système constitue donc un lien important entre les horloges circadiennes et leurs sorties.

Sachant qu'une RF provoque une FAA et une FAC, il était possible que la FEC soit capable d'exercer un contrôle, direct ou indirect, sur le SNS et ainsi d'influer sur une autre sortie des SCN : la sécrétion rythmique de mélatonine par la glande pinéale.

Dans la présente expérience, nous confirmons une perte de rythmicité dans la sécrétion de mélatonine chez des rats SCN lésés nourris *ad libitum*. De manière inattendue, cette sécrétion redevient rythmique lorsque les animaux sont soumis à une RF.

Afin de déterminer si un rétrocontrôle d'une ou plusieurs des sorties connues de la FEC pourrait être responsable de cette restauration, nous avons induit un pic quotidien de corticostérone chez des animaux nourris *ad libitum*, grâce à une immobilisation quotidienne dans les heures précédant l'accès à la nourriture. Ce traitement ne restaure pas le rythme de sécrétion de mélatonine par la glande pinéale, indiquant que la FAC n'est probablement pas à l'origine de ce phénomène. Par contre, une immobilisation quotidienne durant la FAA chez des animaux en RF abolit le rythme de mélatonine, indiquant que le rétrocontrôle de l'activité locomotrice sur le SNS participe au rythme de mélatonine dans la glande pinéale.

Dans une deuxième expérience, nous avons recherché si la FAC pouvait être à l'origine de la genèse ou du maintien de la FAA. Nous avons donc aboli le pic anticipatoire de corticostérone soit par une ablation chirurgicale de la glande surrénale, chez des rats SCN lésés. Cette chirurgie était réalisée avant le début de la RF, afin de déterminer si la corticostérone était essentielle au déclenchement de la FAA. Un second groupe de rats SCN lésés était soumis à la RF et recevait une injection quotidienne de métyrapone, un inhibiteur de la synthèse de corticostérone, une fois que la FAA était stable. Cela devait nous permettre

de déterminer si la corticostérone était essentielle au maintien de la FAA. Ces deux expériences nous ont permis de démontrer que la FAC n'est nécessaire ni à l'établissement, ni au maintien de la FAA. La corticostérone ne peut donc pas être à l'origine de la restauration du rythme de sécrétion de mélatonine en RF, même de manière indirecte.

Nous avons donc démontré que la mélatonine, jusqu'ici considérée comme une sortie exclusive des SCN, peut désormais être considérée comme une sortie indirecte de la FEC.

Restricted feeding in SCN-lesioned rats restores daily rhythms not only of locomotor activity but also of pineal melatonin : role of corticosterone?

Céline A. Feillet¹, Paul Pévet¹ and Etienne Challet¹

¹Department of Neurobiology of Rhythms, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, IFR37, University Louis Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique, 67084 Strasbourg, France.

Number of pages: 19.

Number of figures: 6.

Abstract : 204 words.

Introduction : 568 words.

Discussion : 829 words.

Support for this study was provided by the Centre National de la Recherche Scientifique (E.C.). We would like to thank Dr. Jorge Mendoza for useful comments on this manuscript.

Correspondence should be addressed to Etienne Challet, Department of Neurobiology of Rhythms, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, IFR37, University Louis Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique, 5 rue Blaise Pascal, F-67084 cedex Strasbourg, France. E-mail: challet@neurochem.u-strasbg.fr

Abstract

A food entrainable oscillator (FEO), distinct from the main, light entrainable oscillator residing in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN), is capable of controlling several rhythmic behaviours such as locomotor activity and corticosterone secretion in SCN lesioned rats. The sympathetic nervous system is implicated in the control of food anticipatory corticosterone by the FEO, melatonin secretion by the SCN and can be influenced by locomotor activity. In the present study, we investigated the effects of a daily restricted feeding (RF) on food anticipatory activity (FAA), food anticipatory corticosterone (FAC) and pineal melatonin secretion, in SCN-lesioned rats. Unexpectedly, restricted feeding restored a rhythmic secretion of melatonin in the pineal gland. A daily immobilization stress, although mimicking FAC, does not restore rhythmic secretion of pineal melatonin. Moreover, a daily inhibition of FAA abolishes restoration of rhythmic pineal melatonin. A feedback of FAA on the sympathetic nervous system is probably responsible for the observed effect on melatonin secretion under RF. Additional investigation of the importance of FAC for generation of FAA revealed that corticosterone is neither necessary for generation nor for maintenance of FAA. Thus we found that melatonin, until now exclusive output of the SCN, can also be controlled by feeding cues synchronizing the FEO.

Key words: circadian rhythm, corticosterone, food entrainable oscillator, melatonin, sympathetic nervous system.

Introduction

A master, light-entrainable, circadian clock has been localized in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN) in mammals (Takahashi et al., 2001). Lesions aimed at this structure, although rendering animals arrhythmic, do not prevent rhythmicity induced by a daily restricted feeding (RF; Mistlberger, 1994). This rhythmicity manifests itself in various behavioural and physiological parameters such as locomotor activity, core body temperature and corticosterone secretion. An increasing number of studies show that an oscillator situated outside the SCN and entrained by food is responsible for the control of these parameters (Mistlberger, 1994). When synchronized by a RF, such a Food Entrainable Oscillator (FEO) distributes rhythmic messages that control anticipatory peaks in activity (food anticipatory activity: FAA; Stephan et al, 1979), temperature (food anticipatory thermogenesis: FAT; Krieger et al., 1977; Challet et al, 1997; Recabarren et al, 2005,) and corticosterone (food anticipatory corticosterone secretion: FAC; Krieger et al., 1977; Honma et al., 1984; Diaz-Munoz et al., 2000; Bodosi et al., 2004), thus restoring a circadian rhythmicity.

Corticosterone secretion is achieved by the adrenal gland and controlled *via* both humoral and sympathetic nervous information (Kalsbeek and Buijs, 2002). Considering that no increase of ACTH (the hypophysis hormone triggering corticosterone release) is found during FAC (Wilkinson et al, 1979), it is likely that the FEO controls FAC *via* sympathetic fibres. Moreover, it is known that increased locomotor activity is associated with activation of the sympathetic system (Saris, 1995; Leal-Cerro et al., 2003; Mueller, 2007). So sympathetic pathways may play a role in FEO's outputs..

The sympathetic nervous system (SNS) has also been implicated in melatonin secretion, a well-known output of the circadian system. The SCN control rhythmic melatonin secretion *via* a polysynaptic pathway leading to noradrenaline release by sympathetic terminals in the pineal gland (Larsen, 1999 ; Teclemarian-Mesbah *et al.*, 1999). It cyclically activates the transcription of the Aryl-Alkylamine-N Acetyl Transferase (AA-NAT), the rate limiting enzyme for melatonin synthesis. After SCN lesion (SCN-X), both AA-NAT and melatonin rhythms are abolished (Perreau-Lenz et al., 2003). Knowing that RF increases locomotor activity (FAA) and corticosterone secretion (FAC) in anticipation to mealtime, it is possible that RF could also restore a melatonin rhythm in the pineal gland even without functional SCN. To test this hypothesis, we submitted SCN-X rats to a daily RF. We then demonstrated that RF can restore melatonin rhythm in the pineal gland of SCN-lesioned rats.

To dissociate the possible role of FAA and FAC in this phenomenon, we suppressed FAA in food restricted animals by submitting them to a daily immobilization. In addition, we submitted *ad libitum* fed SCN-X rats to a daily immobilization stress at the time of FAA. This treatment is known to induce a daily rise in corticosterone secretion and then should mimic FAC without RF. We found that RF in SCN-X rats restores a rhythm in pineal melatonin content independently of corticosterone.

Given that RF also restores rhythms in both corticosterone and activity we could not exclude that the rise in corticosterone would trigger FAA, which would in turn feedback on the sympathetic system to elicit melatonin secretion. Although we know that adrenalectomy does not suppress FAA in SCN intact rats (Boulos et al, 1980), its influence in SCN-X animals remains unknown. We then suppressed FAC both by surgical and pharmacological means in SCN-X rats under RF. Because FAA does not originate from anticipatory corticosterone secretion, FAC and FAA appear to be independent outputs of the FEO.

Materials and methods

Animals

All experiments were performed in accordance with the European Committee Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC), and the French Department of Agriculture. For all experiments, 3 months old Long Evans male rats (Janvier, France) were used. After 2 weeks of stabulation, animals were transferred to individual cages equipped with a running wheel to allow activity monitoring. They were kept under 12 hours of light / 12 hours of dark conditions (LD 12/12), with 200 lux light intensity from 0700 h, under constant conditions of ambient humidity and temperature, with food and water provided *ad libitum* unless otherwise stated. In both experiments, animals were weighed every week.

Experimental procedures

Experiment 1: role of corticosterone peak for genesis of melatonin rhythm.

The aim of this experiment was to assess if FAA could restore melatonin secretion on the pineal gland in SCN-X rats under RF. 80 rats were used for this experiment. After SCN lesion (see below), they were left three weeks to recover from surgery? Based on arrhythmic wheel running activity during the 3 weeks of recovery, 63 animals were kept for the next steps of the experiment. Rats were randomly assigned to the *ad libitum* group (AL) or the food restricted group (RF) and transferred to constant dim red light conditions (DD). The RF group was

submitted to a 6 hours food access, ZT0 being the time when food was provided. After 2 weeks of restriction, each group was further divided in 2 groups: the AL (24 rats) and RF (28 rats) groups were kept under the same feeding conditions as above. The ALi (12 rats) and RFi (15 rats) groups were submitted to a 3 hours immobilization (ZT21 to ZT0) in a semi circular tube (diameter : 5 cm) every day for 7 days, to prevent locomotor activity at the time of FAA. On the 7th day of immobilization, all rats were decapitated under deep pentobarbital anaesthesia, at ZT22, ZT4, ZT10 and ZT16. Brains were removed and frozen in cooled isopentane. They were then sliced in a cryostat at the level of the SCN and stained with Cresyl violet to confirm complete SCN lesion. Pineal glands were taken separately to assess for melatonin content by radio-immuno assay (see below).

Experiment 2: role of corticosterone anticipatory peak for genesis and maintenance of FAA.

The aim of this experiment was to test the necessity of the anticipatory rise in corticosterone synthesis for the generation and maintenance of FAA. Thus, we inhibited this peak, either by using adrenalectomized animals or by a daily injection of metyrapone (Sigma, St. Louis, MO, USA). This treatment inhibits stress-induced corticosterone synthesis by suppressing 11 beta steroid hydroxylation (Jenkins et al, 1958). 30 rats were used for this experiment. After undergoing SCN lesion (see below), wheel-running activity was assessed during the 2 weeks of recovery to check for arrhythmicity which would account for a successful lesion. 24 rats were kept for the rest of the experiment. Animals were then randomly assigned to the *ad libitum* fed group (AL: 4 rats) or the restricted fed group (RF: 20 rats). The RF group was further divided into 3 groups: metyrapone injection group (RFm: 8 rats), vehicle injection group (RFs: 7 rats) and adrenalectomized group (RFadX: 5 rats). The RFadX group underwent adrenalectomy the next day (see below). All animals were kept under *ad libitum* conditions until then. After a recovery period of 12 days, all animals were transferred to constant dim light (5-10 lux at the level of the cages) and RF was started for all RF groups. Under this lighting condition, ZT0 was the time of food access, and food was provided for 6 hours. After 17 days of food restriction, a daily subcutaneous injection of metyrapone (100 mg/kg dissolved in 0.9% NaCl + 3% Tween 80) was performed at ZT18 on the RFm group. As a control, we also injected 0.9% NaCl + 3% Tween 80 at the same time to the RFS group and to the AL group to assess for non specific effect of the vehicle or synchronizing effect of the injection respectively. Wheel running was recorded at all times to follow the evolution of FAA. On the 7th day of injection, animals were sacrificed by decapitation under deep pentobarbital anaesthesia, either at ZT22 or at ZT0. Brains were removed and frozen in

cooled isopentane. They were then sliced in a cryostat at the level of the SCN and coloured with Cresyl violet to confirm complete SCN lesion. Blood samples were also taken to measure plasma corticosterone concentration.

Surgery

Electrolytic SCN lesion

After spending 2 weeks in their individual cage, all rats were deeply anesthetized with i.p. 60 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine i.p. and positioned in a stereotaxic head frame with the incisor bar set at + 5 mm. After midline incision of the skin, 2 symmetrical holes were drilled in the skull. A lesion electrode aimed at the SCN, insulated everywhere but at its tip, was descended bilaterally, with an angle of 2° at predetermined coordinates (from Bregma: AP +1.8 mm; ML ± 0.5 mm; DV – 8.4 mm). An anodal current of 1 mA was passed through the electrode for 20 sec. The electrode was then removed, the skin sutured and the animals were left 2 weeks to recover from surgery.

Adrenalectomy

Rats from the RFadX group were deeply anesthetized with i.p. 60 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. Two incisions in the skin and muscles were made on each side of the spine to allow access to the adrenal gland. The adrenal glands were removed, muscles were sutured and a 250 mg corticosterone implant containing 35% corticosterone and 65% cholesterol was inserted subcutaneously. This type of implant is known for providing a constant intermediate level of corticosterone for 2 to 3 weeks (Maurel et al., 2001). The skin was then sutured and the animals were left 12 days to recover. From the day of surgery, all adrenalectomized (adX) animals had free access to NaCl 0.9% containing water to compensate for mineralocorticoid loss after adrenalectomy.

Radio-immuno assays (RIA)

Pineal melatonin content in AL, Ali, RF and RFi rats.

pineal glands were homogenized by sonication in 500 µL 1X PBS and further processed in RIA for melatonin. Briefly, a rabbit polyclonal anti-melatonin antibody (R 19540 INRA, Nouzilly, France) was used at a final concentration of 1/90000. The antibody was added to 200 µL of sample and 100 µL of ¹²⁵I-radiolabeled melatonin (10000 cpm/100 µl). This mix was left overnight at 4°C. The next day, the antibody-linked fraction was precipitated with a sheep/anti-rabbit serum (INRA, Nouzilly, France). After centrifugation, the supernatant was

discarded and pellets, together with standard solutions, were counted in a gamma counter to determine melatonin concentrations.

Protein content was assayed on the remaining pineal homogenates.

Plasma corticosterone content in AL, RFs, RFm and RFadX rats

Corticosterone was assayed with a commercial kit (ICN Biomedical division Carson, CA, USA). All reactives were diluted to half their original concentration to match assay to volumes and concentrations of our plasma samples. All samples were diluted to 1/200 of their initial concentration with the steroid diluent from the kit. The assay was then performed according to a modified manufacturer's protocol. Briefly, 50 μ l of anti-corticosterone antibody, 25 μ l of sample (or standard solution provided in the kit) and 50 μ l of 125 I-radiolabeled corticosterone (6000 cpm/50 μ l) were incubated overnight at 4 °C. The next day, activated charcoal was added to the mix to precipitate linked antibodies. After centrifugation, the supernatant was discarded and pellets, together with standard solutions, were counted in a gamma counter to determine plasma corticosterone concentrations.

Wheel running activity analysis

Mean daily wheel running activity and activity between ZT20 and ZT0 (corresponding to FAA) were quantified during the last 8 days of *ad libitum* feeding, restricted feeding (before immobilization and injection treatments) and during treatment periods, using Clocklab software (actimetrics, Evanston, IL, USA). Loss of rhythmicity after SCN lesion and restoration of a daily rhythmicity by RF were assessed by χ^2 periodogram (Clocklab).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. ANOVAs, with or without repeated measures, followed by post-hoc comparisons with the Tukey test were used to compare more than two groups. Pineal melatonin levels were fitted by a nonlinear least-squares regression using the following cosine-wave equation (cosinor): $y = [A+B \times \cos (2\pi \times (t-C)/24)]$ where y is the level of melatonin, A the mean level of melatonin, B the amplitude of melatonin oscillation, C the acrophase of oscillation and t the time (h).

Results

Experiment 1: role of corticosterone peak for genesis of melatonin rhythm.

The aim of this experiment was to assess if FAA could influence melatonin synthesis by the pineal gland in SCN-lesioned rats under RF. The 63 animals kept for the experiment were arrhythmic as assessed by χ^2 periodogram and histology confirmed complete bilateral lesion of the SCN. Mean daily activity was not different between groups before restriction. After a few days under RF, a clear FAA developed in all restricted groups (fig. 1). When quantifying FAA in the 4 hours preceding access to food, wheel-running activity was significantly higher in the RF and RFi groups compared to the AL and ALi groups (fig. 2). The 3 hours of immobilization abolished activity between ZT21 and ZT0 in both RFi and ALi groups, but did not modify wheel running activity any further during the other 20 h of the day (fig. 1).

Knowing that immobilization can elicit high concentrations of plasma corticosterone, we performed RIA for corticosterone in the plasma of AL, ALi, RF and RFi rats. All immobilized animals showed stress levels of corticosterone at ZT22 and levels comparable to non immobilized rats at all other time points (fig. 3). Cosinor analysis confirmed restoration of a daily rhythm of corticosterone release in ALi and RFi animals.

RIA assay of pineal melatonin revealed different profiles: no significant oscillation was detected in AL, ALi and RFi rats. A clear restoration of a rhythmic pineal melatonin secretion was observed in RF animals with a peak at ZT10, which was confirmed by cosinor analysis. A significant effect of both RF and immobilization were revealed by ANOVA ($p < 0.05$) accounting for restoration of a melatonin rhythm under RF and a disappearance of that rhythm under immobilization condition (fig 3). So it is probable that FAA is essential for restoration of a rhythm in melatonin secretion in SCN-X animals. This observation is reinforced by the fact that this rhythm disappears in RFi animals. Also note that no rhythm in pineal melatonin could be detected in ALi animals, thus demonstrating that a daily peak of corticosterone cannot by itself restore a rhythm in melatonin secretion.

Experiment 2: Role of corticosterone for genesis and maintenance of FAA.

The aim of this experiment was to test the necessity of the anticipatory rise in corticosterone synthesis for the generation and maintenance of FAA. Thus, we inhibited this peak, either by using adrenalectomized animals or by a daily injection of metyrapone. All 24 SCN-lesioned rats were arrhythmic as assessed by χ^2 periodogram. Mean daily activity was not different between groups before restriction. After a few days under RF, a clear FAA developed in all

restricted groups (fig. 4). Appearance of FAA was concomitant with a significant increase in daily wheel running activity that was significantly higher in the RFs group ($p < 0.05$). FAA was significant in the RFs group compared to AL group (fig. 5; $p < 0.05$). Moreover, no statistical difference could be detected in FAA intensity between RFs, RFadX and RFm before injections ($p > 0.05$) indicating that FAC is not essential for the generation of FAA. Nonetheless, a significant difference was observed after metyrapone treatment between RFs and RFm groups and within the RFm group when comparing before and after treatment conditions ($p < 0.05$). The ratio of FAA compared to total daily activity was nonetheless conserved. The significant effect of metyrapone would suggest the implication of FAC in maintenance of FAA, but we cannot fully exclude an influence of vehicle injection on activity as we also found a significant reduction in daily activity in the AL group injected with saline ($p < 0.05$). FAA was though still evident and significant differences between RFm and AL groups were still detectable ($p < 0.05$; fig. 5).

RIA for corticosterone revealed that, as expected, metyrapone injection at ZT21 inhibited the FAC, levels of corticosterone being intermediate (200 ng/ml) at both ZT22 and ZT0 (fig. 6), which also correspond to levels observed in the AL group at ZT22. Corticosterone implants restored the same levels in RFadX rats (fig. 6). Higher mean levels (370 ng/ml) were observed in RFs animals, though not significantly different from AL rats probably due to high dispersion. Higher levels (430 ng/ml) with smaller dispersion were observed in this group at ZT0 when the FAC is supposed to be maximal. It was significantly different from the RFm group confirming inhibition of FAC by metyrapone injection. These results rule out corticosterone as an essential message for generation of FAA but do not permit to fully exclude its implication in maintenance and stabilization of FAA.

Discussion

The present study aimed at testing if RF can influence a well known output of the SCN, in SCN-X animals: melatonin synthesis by the pineal gland. Our results confirmed that melatonin displays no daily variation in SCN-X rats fed *ad libitum* (Perreau-Lenz et al, 2003). Importantly, our results in the RF group show that a rhythmic melatonin secretion can be restored by RF in the pineal gland of SCN-X rats. It is known that RF induces both a FAA and a FAC (Mistlberger, 1994; Honma et al., 1984) Thus at least two causes could explain how RF restores melatonin rhythm in the pineal gland: the rise in plasma corticosterone and/or the rise in wheel-running activity in anticipation to feeding, that would feedback on the pineal gland. To test the first hypothesis, we submitted SCN-X rats fed *ad libitum* to a daily immobilization at the time of anticipation (ALi group). This treatment is known to elicit a daily peak of corticosterone due to restraint stress but is not equivalent to restricted feeding in terms of entrainment (Ottenweller et al, 1987). When assaying pineal melatonin in the ALi group, we did not find any restoration of its rhythm. Thus it is probable that FAC does not trigger the observed phenomenon on melatonin in the RF group. Our second hypothesis was that FAA was responsible for the *de novo* rhythmic content of melatonin in the pineal gland: it is known that locomotor activity can feedback on the SNS (Saris, 1995; Leal-Cerro et al., 2003; Mueller, 2007). So we postulated that restoration of melatonin rhythm would be a consequence of a feedback of locomotor activity on the SNS that would trigger melatonin secretion in the pineal gland. Thus we submitted RF animals to a daily immobilization at the time of FAA, to suppress locomotor activity (RFi group). As expected, this treatment abolishes the rhythm of melatonin content in the pineal gland, that was otherwise observed in the RF group. Therefore it seems that FAA is necessary for rhythmic melatonin secretion by the pineal gland in SCN-X rats. Hence we demonstrate that the FEO can indirectly control a well-known, and until now exclusive, output of the SCN. We have then identified a new putative output of the FEO.

Considering those results on the relative independency of melatonin rhythm restoration to corticosterone secretion, we could not rule out that anticipatory corticosterone could be a primary output of the FEO, triggering FAA that would be then an indirect output of the FEO. Thus we could not exclude that the rise in corticosterone would trigger FAA, which would in turn feedback on the sympathetic system to elicit melatonin secretion. Moreover, no previous study had explored the effect of the absence of corticosterone secretion on the genesis and maintenance of FAA in SCN-X animals. In our second experiment, we inhibited FAC by

means of adrenalectomy or a daily injection of metyrapone, in SCN-X rats. *Ad libitum* and food restricted animals injected with saline at the time of metyrapone injection were used as controls. In the ALs group, no rhythmicity was detected at anytime. A significant decrease in wheel-running activity was detected in this group after the injection even with vehicle, showing a deleterious effect of the injection/vehicle on locomotor activity. Nevertheless, such an effect was not detected in the RFs group. As expected in the RFs group, a clear FAA developed within a few days after the start of RF. FAA was also evident in the RF + adrenalectomy group and was equivalent to that observed in the RFs group. This result indicates that FAC and corticosterone are not essential for generation of FAA. In the RF + metyrapone injection group, FAA developed as in the RFs group before the injection. After the injection, a significant decrease in general activity could be detected like in the ALs group, but FAA was still evident in the RFm group. If we cannot fully exclude a modulatory effect of FAC on FAA intensity, it is clear that corticosterone is not essential for maintenance of FAA.

Taken as a whole, this study demonstrates that a rhythmic daily secretion of melatonin can be restored by RF in the pineal gland of SCN-X rats. Both FAA and rhythmic melatonin secretion in this context seem to be corticosterone independent, or at least, corticosterone seems to be dispensable for generation of these two phenomena. Additional experiments will be needed to assess the modulatory role of corticosterone.

Finding melatonin as another output of the FEO provides new insights in the field of food synchronization: structures and tissues otherwise insensitive to feeding cues and expressing melatonin receptors, could be indirect targets of the FEO via the control of melatonin secretion. When the main cerebral clock is lacking, feeding cues can synchronize the FEO and restore a global temporal organization not only for locomotor activity, but also for hormones secretion, including corticosterone and melatonin. Such an overall rhythmicity could be mediated via daily activation of the sympathetic nervous system.

References

- Bodosi B., Gardi J., Hajdu I., Szentirmai E., Obal F. J. r. and Krueger J. M. (2004) Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, 1071-1079.
- Boulos Z., Rosenwasser A.M., Terman M. (1980) Feeding schedules and the circadian organization of behaviour in the rat. *Behav Brain Res* **1**, 39-65.
- Challet E, Pevet P, Vivien-Roels B, Malan A. (1997c) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* **12**, 65-79.
- Diaz-Munoz M., Vazquez-Martinez O., Aguilar-Roblero R. and Escobar C. (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, 2048-2056.
- Honma K.I., Honma S., Hiroshige T. (1984) Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles. *Am J Physiol.* **246**, 721-726.
- Jenkins, J.S., Meakin, J.W., Nelson, D.H. & Thorn, G.W. (1958) Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. *Science* **128**, 478-480.
- 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.
- Krieger D.T., Hauser H., Krev L.C. (1977) Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* **197**, 398-399.
- Leal-Cerro A., Gippini A., Amaya M.J., Lage M., Mato J.A., Dieguez C., Casanueva F.F. (2003) Mechanisms underlying the neuroendocrine response to physical exercise. *J Endocrinol Invest* **26** 879-885. Review.
- Larsen P. J. (1999) Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* **46**, 296-304.
- Maurel D., Sage D., Mekaouche M., Bosler O. (2001) Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia* **29**, 212-221.
- Mistlberger R. E. (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* **18**, 171-195.
- Mueller P.J. (2007) Exercise training and sympathetic nervous system activity: evidence for physical activity dependent neural plasticity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **34**, 377-384.

- Ottenweller J. E., Pitman D. L. and Natelson B. H. (1987) Repeated stress at the same time of day does not mimic timed feeding in its effects on the plasma corticosterone rhythm in rats. *Chronobiologia* **14**, 1-6
- Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Garidou M. L., Wortel J., van der V. I. 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.
- Recabarren M. P., Valdes J. L., Farias P., Seron-Ferre M. and Torrealba F. (2005) Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity responses to feeding in rats. *Neuroscience* **134**, 1413-1422.
- Saris W.H. (1995) Effects of energy restriction and exercise on the sympathetic nervous system. *Int J Obes Relat Metab Disord Suppl* **7** S17-S23. Review.
- Stephan F. K., Swann J. M. and Sisk C. L. (1979) Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* **25**, 545-554.
- Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (2001) Circadian clocks. In: Handbook of behavioural neurobiology (Plenum Publishers) New York: Kluwer Academics.
- Tecler-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.

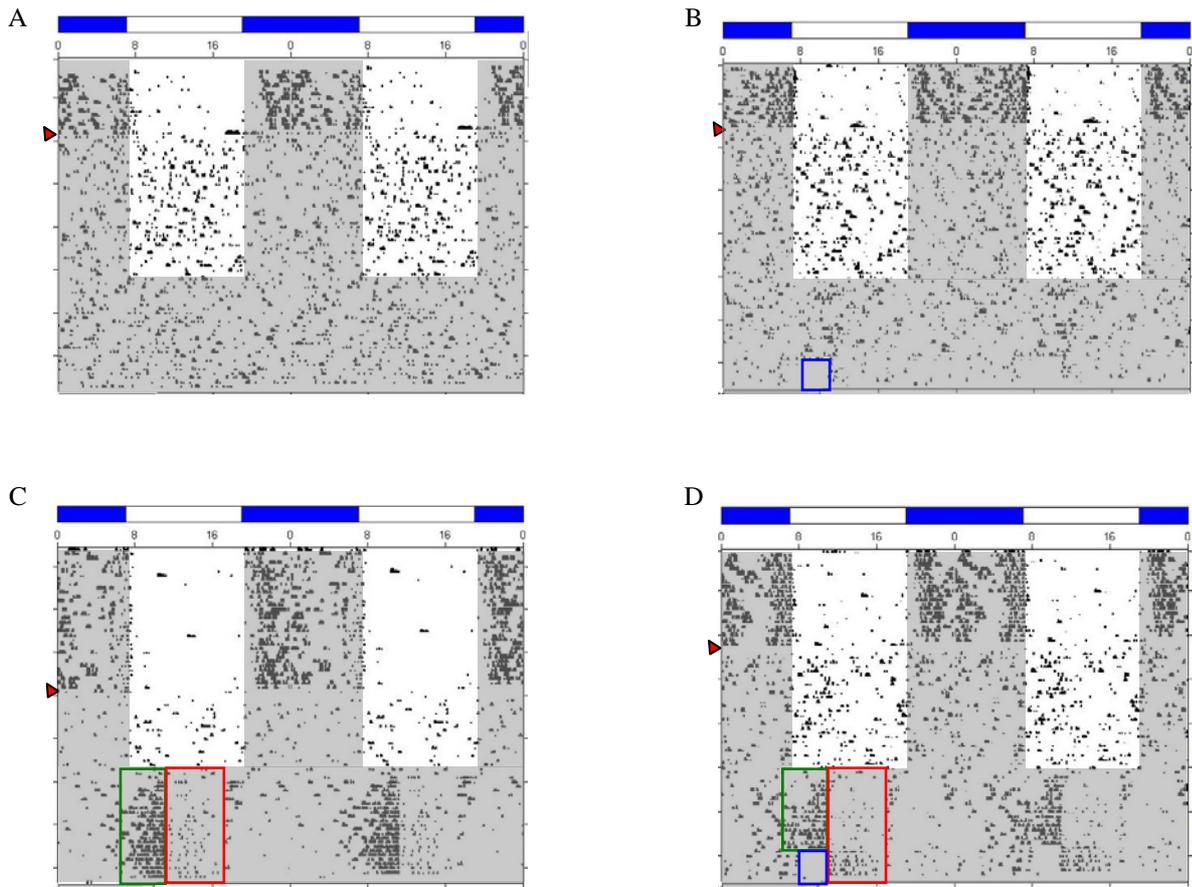


Figure 1: Influence of RF and immobilization on rhythms of wheel running activity in SCN lesioned rats.

Double-plotted actograms of SCN-X rats, representative of each group: (A) AL group, (B) ALi group, (C) RF group, (D) RFi group. Red arrows mark the day of SCN lesion. Note the development and persistence of FAA (green box) in all RF groups. Lighting conditions are indicated in the background, grey shading indicating the dark period. The red and blue boxes show access to food during RF and immobilization period, respectively.

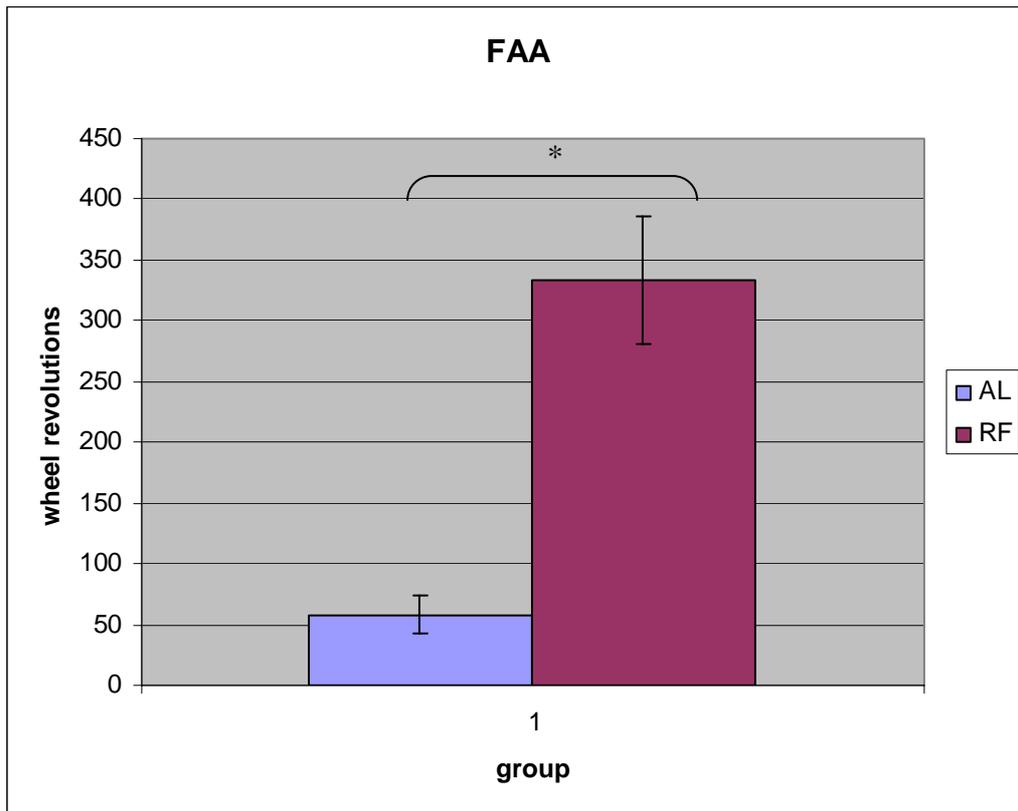


Figure 2: Influence of RF on Food Anticipatory Activity in SCN-lesioned rats. Histograms represent mean wheel counts \pm SEM between ZT20 and ZT0 in the AL and RF group, before immobilization.

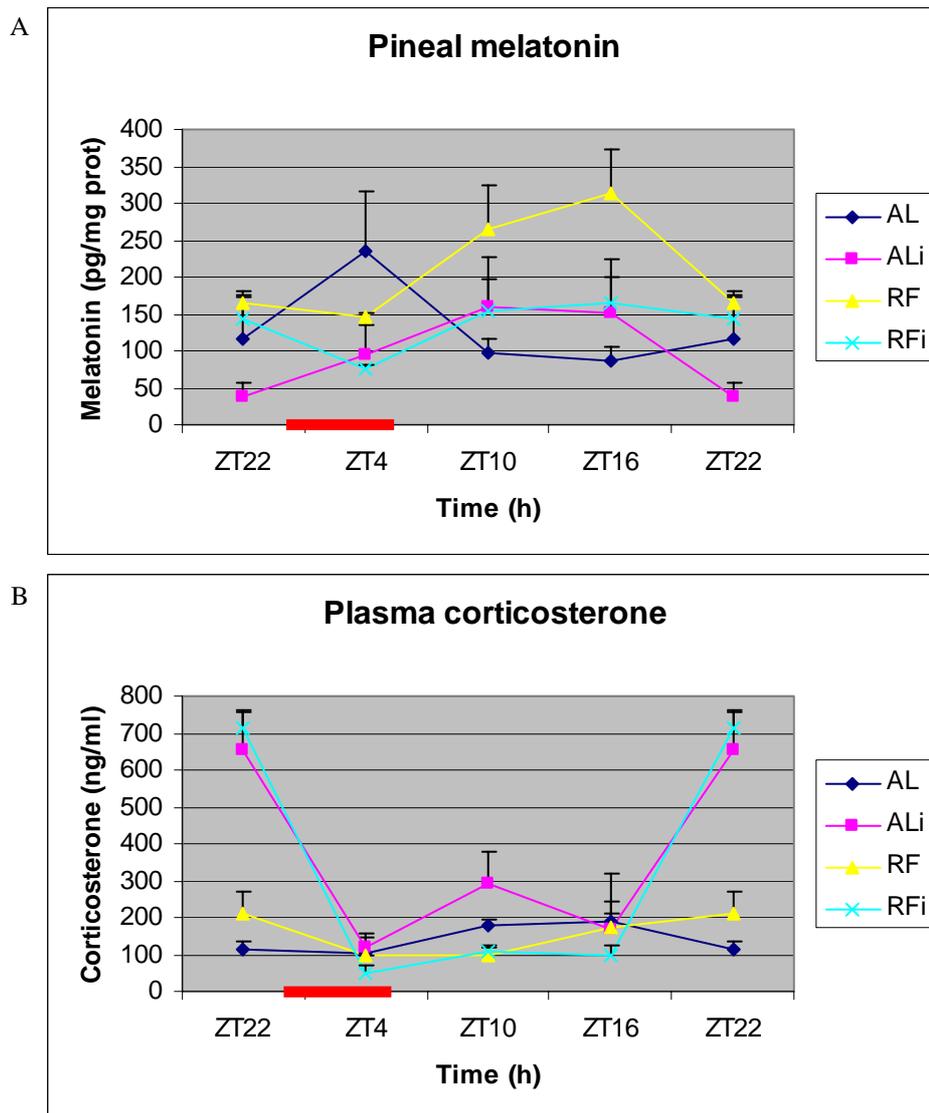


Figure 3: pineal melatonin (A) and plasma corticosterone (B) in AL, ALi, RF and RFi rats. AL, ALi, RF and RFi groups are represented in dark blue, pink, yellow and light blue respectively. All curves represent mean values \pm SEM. The ZT22 point was double plotted to increase readability but was not used for statistical analysis. Red boxes indicates timing of food availability under RF.

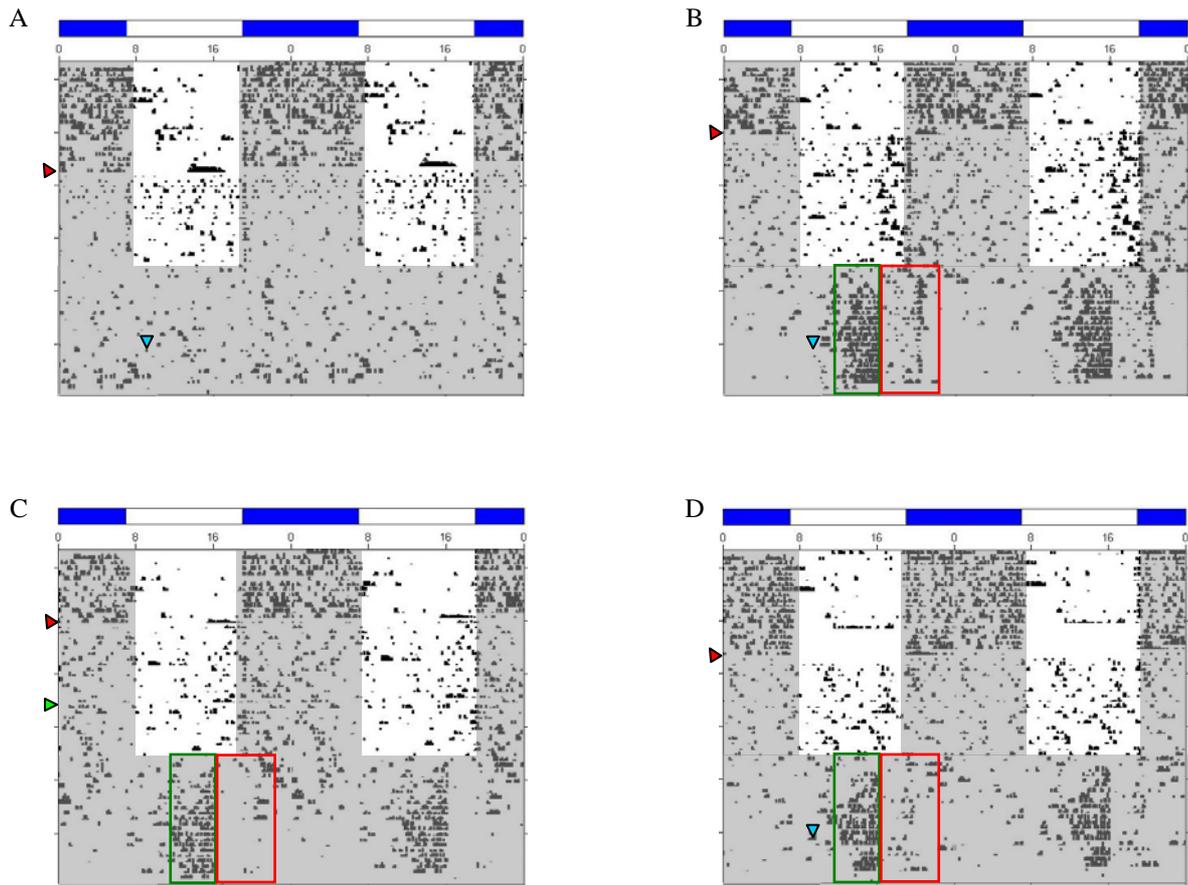


Figure 4: Importance of FAC for FAA.

Double-plotted actograms of SCN-X rats, representative of each group: (A) AL group, (B) RFs group, (C) RFadX group, (D) RFm group. Red, green and blue arrows mark the day of SCN lesion, adrenalectomy and first day of injection respectively. Note the development and persistence of FAA (green box) in all RF groups. Lighting conditions are indicated in the background, grey shading indicating the dark period. The red box shows access to food during RF.

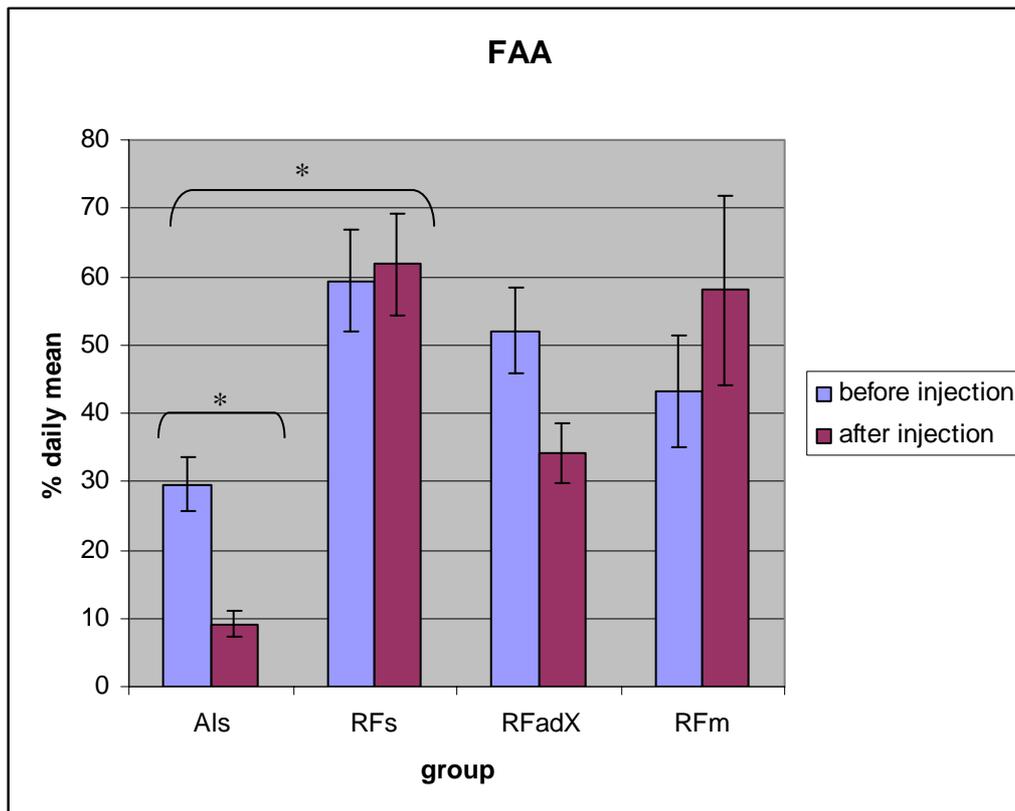


Figure 5: Influence of RF, adrenalectomy and metyrapone injection on Food Anticipatory Activity (FAA) in SCN-lesioned rats.

Histograms represent % of activity compared to total daily activity \pm SEM, between ZT20 and ZT0 in the ALs, RFs, RFadX and RFm groups, before and after injection treatment. Stars show statistical difference between two groups ($p < 0.05$).

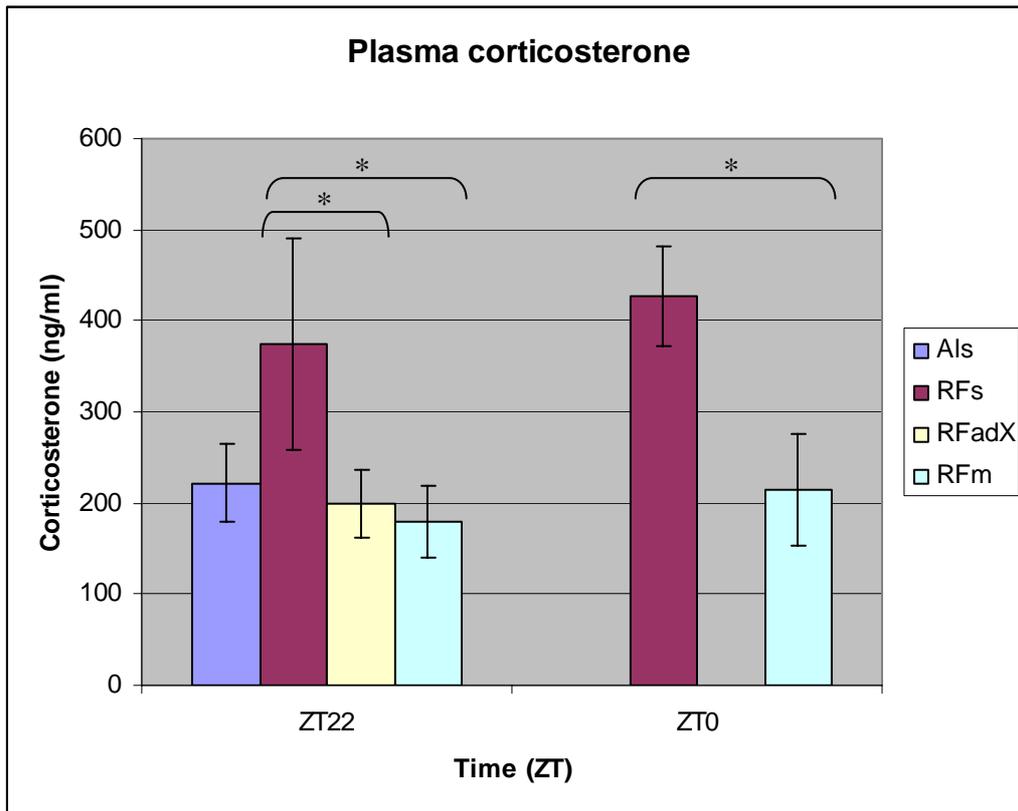


Figure 6: Plasma corticosterone in AL (ZT22), RFs (ZT22, ZT0), RFm (ZT22, ZT0) and RFadX (ZT0).

Data are presented as mean concentration in ng/ml \pm SEM. Stars show statistical difference between two groups ($p < 0.05$).

IV. Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice.

À la différence des SCN, pour lesquels la lumière est le synchroniseur le plus puissant, les oscillateurs centraux et périphériques sont très sensibles à une restriction de l'accès à la nourriture. Lors d'une restriction alimentaire, les rongeurs expriment une FAA qui correspondrait au comportement de recherche alimentaire dans des conditions naturelles. Ce phénomène est observé à la fois pour l'activité locomotrice et la température corporelle, qui augmentent dans les heures précédant l'accès à la nourriture. Ces paramètres sont considérés comme des sorties de l'horloge alimentaire, entité qui permettrait l'estimation de l'heure de disponibilité alimentaire.

Alors que la machinerie moléculaire des SCN implique un ensemble de gènes horloges, les mécanismes sous-tendant la synchronisation alimentaire et le fonctionnement de l'horloge alimentaire restent mal connus.

Les gènes *Npas2* et *Cry1/Cry2* ont été identifiés comme acteurs moléculaires possibles de l'horloge alimentaire, mais les altérations phénotypiques observées lorsque ces mutants sont soumis à une restriction alimentaire sont assez modérées.

Les gènes *Per* ont été largement impliqués dans la synchronisation des SCN par la lumière, et il était donc probable qu'il soient également impliqués dans des mécanismes de synchronisation plus généraux. Nous avons donc étudié le rôle des gènes *Per1* et *Per2* dans la genèse du comportement anticipatoire en réponse à une restriction alimentaire quotidienne. Pour ce faire, nous avons soumis des souris *Per1* knock out (KO), *Per2* mutantes (*Per2^{Brdm1}*) et sauvages (WT), à une restriction alimentaire et mesuré leur activité locomotrice et leur température corporelle, dans 3 conditions d'éclairement (LD, DD, LL).

Alors que l'activité anticipatoire est parfaitement normale chez les WT et les *Per1* KO, nous avons observé que la FAA est totalement absente chez les *Per2^{Brdm1}* aussi bien dans l'activité de roue que dans l'activité générale et la température. Par contre, concernant la température, la réponse de thermogenèse suivant l'accès à la nourriture est tout à fait normale. L'absence de FAA ne semble pas être la conséquence d'une déplétion plus importante en énergie chez ces mutants. Le fait que la FAA soit absente dans les trois conditions d'éclairement, y compris en obscurité constante, élimine la possibilité que les souris ne courent pas en conséquence d'une photophobie accrue.

Afin de compléter ces résultats comportementaux, nous avons mesuré l'expression de gènes horloges et de gènes contrôlés par l'horloge dans les SCN et les tissus périphériques de souris WT, *Per1* KO et *Per2^{Brdm1}*, en conditions de restriction calorique et *ad libitum*. L'expression des gènes horloges dans les SCN est altérée par une restriction calorique, de manière différentielle entre les génotypes. Comme démontré auparavant, la restriction alimentaire affecte de façon majeure la phase d'expression des gènes horloges dans le foie et les reins. Les déphasages observés sont comparables entre les génotypes, ce qui indique que la

synchronisation par la nourriture ne repose pas sur les gènes *Per* dans les tissus périphériques.

Cette étude démontre donc qu'une mutation du gène *Per2* abolit l'anticipation des repas sans interférer avec la synchronisation alimentaire des tissus périphériques. Elle révèle *Per2* comme l'un des acteurs majeurs de la synchronisation alimentaire au niveau central et probablement de la machinerie moléculaire sous-tendant le fonctionnement de l'horloge alimentaire.

Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice : report and supplemental data

Céline A. FEILLET, Jürgen A. RIPPERGER, Maria Chiara MAGNONE, Abdul DULLOO, Urs ALBRECHT, and Étienne CHALLET

Current biology, 2006, Vol. 16, Pages 2016-2022

Copyright © 2006 Elsevier Ltd All rights reserved.

Pages 140-146 et 147-152 :

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.cub.2006.08.053> (report)

<http://www.current-biology.com/cgi/content/full/16/20/2016/DC1/mmc1.pdf>

(supplemental data)

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

V. Forebrain oscillators ticking with different clock hands.

La machinerie moléculaire des SCN repose sur des boucles de rétroaction composées de gènes horloges tels que *Per1-2*, *Cry1-2*, *Bmal1* et *Clock*.

Une expression rythmique des gènes *Per1* et *Per2* a été observée dans de nombreuses structures centrales hors SCN.

Cependant, les entités fonctionnelles des boucles moléculaires sont les protéines horloges. Pourtant, à part dans les SCN où leur expression est bien établie, ainsi que dans un nombre limité de structures centrales, les patrons d'expression de PER1 et PER2 sont peu connus.

Nous avons donc étudié par immunohistochimie, chez des souris nourries *ad libitum*, les rythmes d'expression des protéines PER1 et PER2 dans le striatum dorsal (dST), le noyau paraventriculaire thalamique (PVT), les noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN), le cortex piriforme antérieur (aPirC), les noyaux dorsomédiaux de l'hypothalamus (DMH), les noyaux ventromédiaux de l'hypothalamus (VMH), les noyaux arqués (Arc), l'hippocampe, l'amygdale centrale (CEA) et basolatérale (BLA).

Nous démontrons ainsi que PER1 et PER2 ne sont pas exprimées uniformément dans le télencéphale de la souris, certaines structures exprimant soit l'une ou l'autre des protéines, soit les deux ensembles. De même, leur phase d'expression n'est pas identique dans toutes les structures quantifiées.

Afin de rendre compte de la fonctionnalité de cette expression différentielle, des souris mutantes pour les gènes *Per1* ou *Per2* ont été utilisées. Nous avons réalisé des hybridations *in situ* pour le gène *Cry1* dans les mêmes structures que celles utilisées pour l'immunohistochimie, chez ces souris nourries *ad libitum*. Le gène *Cry1* est un gène horloge de la boucle négative principale, tout comme *Per1* et *Per2*. nous avons formulé l'hypothèse que si PER1 est exprimé seul dans une structure, l'expression des autres gènes horloges, par exemple de *Cry1*, sera altérée dans cette structure chez des *Per1* mutants mais pas chez des *Per2* mutants. Inversement, si c'est PER2 qui est exprimé dans une structure, l'expression de *Cry1* pourrait être altérée chez des *Per2* mutants. Enfin, dans les structures exprimant les deux protéines, on observera une altération différentielle du rythme de *Cry1* chez les *Per1* et les *Per2* mutants. Ces expériences ont été réalisées en prenant des souris sauvages de la même souche que les mutantes, maintenues dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus sont en adéquation avec nos hypothèses et lorsqu'une structure exprime PER1 et/ou PER2, des altérations dans l'expression de *Cry1* sont observées dans les mutants respectifs, comparés à des souris sauvages nourries *ad libitum*.

Une restriction alimentaire produit des changements physiologiques et comportementaux, qui sont plus marqués lors d'une restriction calorique. L'expression des gènes horloges peut être modifiée dans les SCN, les oscillateurs cérébraux hors SCN et les tissus périphériques par ce type de restriction. Les gènes *Per*, et *a fortiori* les protéines PER, sont impliquées dans la

synchronisation des SCN par la lumière, et dans des mécanismes plus larges de synchronisation, comme démontré dans l'article précédent. Il est donc important, pour comprendre les mécanismes de la synchronisation alimentaire et son intégration par les différentes structures, d'étudier la réponse des protéines PER1 et PER2 à une restriction calorique, dans différentes structures du cerveau antérieur. Nous avons ainsi établi que certaines structures comme l'hippocampe ne répondent pas ou peu à la restriction calorique. Pour toutes les autres structures, le niveau d'expression de PER1 est augmenté et le rythme d'expression de PER2 est décalé en réponse à la restriction calorique. Le rythme d'expression de *Cry1* est modifié par la restriction calorique dans les structures étudiées. Cependant, tout comme pour la condition *ad libitum*, les profils d'expression observés sont différents en fonction du génotype : les profils d'expression de *Cry1* sont altérés chez les *Per1* mutants dans les structures exprimant normalement PER1 chez des souris sauvages et chez les *Per2* mutants dans les structures exprimant normalement PER2, chez les souris sauvages, en réponse à une restriction calorique.

PER1 et PER2 étant importants pour la synchronisation, l'altération de leur expression dans des structures cérébrales, corroborée par l'altération différentielle de l'expression des gènes horloges chez des mutants *Per* en réponse à une restriction alimentaire, donne des indices sur les structures importantes pour la synchronisation alimentaire.

De plus, le fait que les protéines PER ne soient pas exprimées de manière uniforme dans le système nerveux central suggère que les mécanismes de l'horloge, jusqu'ici supposés ubiquitaires, pourraient être partiellement modifiés, de nombreux oscillateurs cérébraux fonctionnant avec différentes aiguilles de l'horloge (différents gènes).

Forebrain oscillators ticking with different clock hands*

Céline A. Feillet^{1,3}, Jorge Mendoza^{1,3}, Urs Albrecht², Paul Pévet¹ and Etienne Challet^{1,4}

¹Department of Neurobiology of Rhythms, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, IFR37, University Louis Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

²Department of Medicine, Division of Biochemistry, University of Fribourg, 1700 Fribourg, Switzerland.

³these authors contributed equally to this work.

⁴Corresponding author.

E-mail: challet@neurochem.u-strasbg.fr

Tel +33 3 88 45 66 93

Fax +33 3 88 45 66 54

*Supported by Swiss-French Funds “Programme d’actions intégrées Germaine de Staël” (U.A. and E.C.), the Swiss National Science Foundation, the State of Fribourg and EUCLOCK (U.A.), the Centre National de la Recherche Scientifique (E.C.), the Institut Servier (J.M.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (J.M.).

Abstract

Clock proteins like PER1 and PER2 are expressed in the brain, but little is known about their functionality outside the main suprachiasmatic clock. Here we show that PER1 and PER2 were neither uniformly present, nor identically phased in forebrain structures of mice fed *ad libitum*. Altered expression of the clock gene *Cry1* was observed in respective *Per1* or *Per2* mutants. In response to hypocaloric feeding, PERs timing was not markedly affected in few forebrain structures (hippocampus). In most other forebrain oscillators, including those expressing only PER1 (*e.g.*, dorsomedial hypothalamus), PER2 (*e.g.*, paraventricular hypothalamus) or both (*e.g.*, paraventricular thalamus), PER1 was up-regulated and PER2 largely phase-advanced. *Cry1* expression was selectively modified in the forebrain of *Per* mutants challenged with hypocaloric feeding. Our results suggest that there is not one single cerebral clock, but a system of multiple brain oscillators ticking with different clock hands and differentially sensitive to nutritional cues.

Key words: circadian rhythm, clock proteins, Period, Cryptochrome, DBP, Per mutant.

Introduction

In mammals, the master circadian clock which synchronizes physiology and behaviour, resides in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN) and is reset by light/dark cycles (Takahashi et al., 2001). The SCN clockwork relies on feedback loops in which the CLOCK/BMAL1 heterodimer activates the transcription of three *Period* (*Per1-3*), two *Cryptochrome* (*Cry1-2*) genes and clock-controlled genes such as *Dbp* (*albumin D-site binding protein*). PER and CRY dimers act as negative regulators of CLOCK/BMAL1 (Albrecht, 2004; Ko and Takahashi, 2006). *Per1* and *Per2* genes are the principal actors of SCN resetting (Albrecht et al., 1997; 2001; Zheng et al., 2001).

A number of extra-SCN oscillators have been identified in the mammalian brain (Rev. in Guilding and Piggins, 2007). For instance, rhythmic expression of *Per1* and *Per2* mRNA is observed in forebrain structures such as olfactory bulbs, piriform and cerebral cortices, hippocampus, paraventricular and arcuate hypothalamic nuclei (Asai et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001; Abe et al., 2002; Granados-Fuentes et al., 2004). PER2 expression has also been reported in limbic structures, such as amygdala and bed nucleus of the stria terminalis (Amir et al., 2004; Lamont et al., 2005). Except for the SCN in which the rhythm of PERs follows the mRNA expression by 4-6 h (Field et al., 2000; Mendoza et al., 2007), little is known about the exact timing of both PER1 and PER2 oscillations in forebrain structures. For that purpose, we investigated the daily patterns of PER1 and PER2 expression throughout the forebrain in mice fed *ad libitum*. Furthermore, to assess the functional significance of PER1 or PER2 oscillations in forebrain structures, we tested the first hypothesis that their molecular clockwork, as assessed by oscillations of *Cry1* and *Dbp* mRNA levels, would be specifically altered in *Per1* or *Per2* mutant mice fed *ad libitum*.

Whereas light is the principal synchronizer for the SCN, *Per* oscillations in extra-SCN brain regions can be affected by feeding cues (Wakamatsu et al., 2001; Lamont et al., 2005; Angeles-Castellanos et al., 2007). Restricted feeding can produce changes in physiology and behaviour which are even more marked in response to hypocaloric feeding (HF) (Challet et al., 2003; Mendoza et al., 2005b; Feillet et al., 2006). Rodents exposed to restricted feeding or HF express a bout of locomotor activity in the hours preceding access to food. That so-called food-anticipatory activity is supposed to be controlled by a circadian clock outside the SCN (Mistlberger, 1994; Stephan, 2001). *Per2* mutant mice do not show food-anticipatory activity, pointing out the essential involvement of *Per2* in the anticipation of mealtime (Feillet et al., 2006). Thus, finding alterations in protein level of PER2 in forebrain areas in response to food restriction may help to identify structures relevant for food synchronization. For that purpose, we assessed the expression of both PER1 and PER2 proteins throughout the forebrain of mice challenged with HF. To evaluate the role of PER1 and PER2 in the adaptation of forebrain oscillators to food restriction, we hypothesized that HF-induced changes in their clockwork, evaluated via oscillations of *Cry1* and *Dbp* expression, would be selectively impaired in *Per1* or *Per2* mutant mice.

Results

Daily patterns of wheel-running activity

All mice fed *ad libitum* displayed a regular pattern of locomotor activity, with predominant wheel-running activity during nighttime. When restricted to feed only a hypocaloric diet (HF) during daytime, WT mice (*i.e.*, C3H and C57BL×129Sv) and *Per1* mutant (*Per1*^{-/-}) mice developed a daily bout of activity in anticipation of feeding time. By contrast, *Per2* mutant (*Per2*^{*Brdm1*}) mice did not show food-anticipatory activity (Fig. 1), in accordance with previous findings (Feillet et al., 2006).

PER1 and PER2 expression in the forebrain of mice fed ad libitum

To test whether the expression of PER1 and PER2 was ubiquitous in the forebrain, we performed immunohistochemistry for both proteins in mice fed *ad libitum*. PER1 and PER2 were not both expressed in all structures quantified. In particular, PER1 was expressed alone in aPirC, dST and DMH; it was rhythmic ($p < 0.05$) with fitted peak values at ZT17, ZT19 and ZT9, respectively (Table 1, Figs. 2A and 3A), as assessed with cosinor analysis.

PER2 was expressed alone in BLA, PVN and VMH; it was rhythmic ($p < 0.05$) with daily peaks at ZT21, ZT15, and ZT15, respectively (Table 1, Figs. 2B and 3B). Data obtained for PER2 expression in BLA confirm previous results gathered in rats (Lamont et al., 2005).

Immunoreactive (IR) signals to both PER1 and PER2 were detected in CA1, DG, CEA, PVT and Arc; they were found rhythmic in all cases ($p < 0.05$; Figs. 2A, 2B and 3C). PER1 and PER2 peaked in phase just before dark-light transition (*i.e.*, ZT22) in CA1 and DG, and at ZT16 in the PVT (Figs. 2A and 3C). In both CEA and Arc, PER1 and PER2 IR displayed different patterns, with respective peaks around ZT13/14 and ZT18/19 (Figs. 2A and 3C, Table 1). In CEA, timing of PER2 expression in mice does not match exactly that found in rats (*i.e.*, peak at ZT13; Lamont et al., 2005; Waddington-Lamont et al., 2007). As a whole, there is a differential expression of PER1 and PER2 in forebrain structures of mice fed *ad libitum*.

Modifications of PER1 and PER2 expression in the forebrain of mice in response to hypocaloric feeding (HF)

Next we studied mice exposed to HF compared to the *ad libitum* condition. This procedure led to a significant body mass loss (19.4 ± 0.3 vs. 25.9 ± 0.5 g, respectively, $n = 24$; $p < 0.05$). Modifications in PER1 and/or PER2 IR were investigated in the forebrain of mice challenged with HF. In the aPirC of HF mice, a 3 h phase-advance was detected in the daily oscillation of PER1 compared to the *ad libitum* condition (Fig. 3A, Table 1).

In DMH, while the phase of daily PER1 expression was unchanged with high values around ZT11, both its mean level and amplitude were increased under HF conditions in comparison with *ad libitum* values ($p < 0.05$; Figs. 2A and 3A). As in DMH, increased level and amplitude of PER1 expression were observed in dST (Fig. 3A, Table 1).

For PER2 IR in PVN, there was a large (9 h) phase-advance ($p < 0.05$), accounting for opposite patterns between HF and *ad libitum* feeding conditions (Fig. 3B, Table 1). Rhythmic expression of PER2 in the VMH was advanced by 7 h (peak around ZT8) compared to the *ad libitum* condition. It was also up-regulated, as shown by higher mean level (Figs. 2B and 3B). In BLA, the daily rhythm of PER2 in HF mice was no longer significant (Table 1), due to an apparent bimodal shape (Fig. 3B).

In Arc and PVT, where both PER1 and PER2 were found to be expressed under *ad libitum* conditions, the daily patterns of these proteins were still rhythmic under HF ($p < 0.05$, Table 1). In keeping with the observation made in DMH and dST, levels of PER1 were significantly up-regulated in both Arc and PVT due to higher means ($p < 0.05$; Figs. 2A and 3C, Table 1), whereas the peak time remained unchanged (Arc: ZT13 and PVT: ZT16). PER2 was also found rhythmic in both cases ($p < 0.05$). A large phase-advance was observed in both Arc and PVT where the peak time was advanced by 5 and 6 h, respectively (Figs. 2B and 3C). In CEA, PER1 expression under HF was globally up-regulated due to an increase in both mean level and amplitude, while PER2 IR was phase-advanced by 6 h (Fig. 3C, Table 1), in accordance to previous observations in food-restricted rats (Waddington-Lamont et al., 2007). In response to HF, a 3 h phase-advance of PER1 oscillations was detected in both DG and CA1. For PER2 expression, there is a lack of responsiveness to calorie restriction in those two structures (Figs. 2 and 3C, Table 1).

To sum up, we established that there is a differential expression of PER1 and PER2 in the forebrain of mice fed *ad libitum* and that their expression patterns are not uniformly altered by timed HF. In forebrain structures expressing PER1, a small set including aPirC, CA1 and DG displays phase-advanced oscillations of PER1 (≤ 3 h) while in the others, (*i.e.*, CEA, PVT, DMH and Arc), PER1 is up-regulated in response to HF. Except for CA1 and DG in which the timing of PER2 oscillations remains unaffected by HF, in other forebrain structures expressing PER2 (*i.e.*, CEA, PVN, PVT, VMH and Arc), PER2 oscillations are phase-advanced by at least 5 h in response to HF.

Cry1 and Dbp expression in WT, Per1 KO and Per2^{Brdm1} mutant mice fed ad libitum

We measured *Cry1* and *Dbp* expression in the forebrain of WT, *Per1* KO and *Per2^{Brdm1}* mutant mice fed *ad libitum* (Figs. 4 and 5) and raised a first hypothesis that differential expression of PER proteins in the forebrain should be mirrored in alterations of the clockwork in respective *Per* mutant mice under *ad libitum* conditions. If PER1 or PER2 protein is expressed alone in a structure, then clock mechanisms should be impaired in *Per1* KO mice or *Per2^{Brdm1}* mutant mice, respectively. If both proteins are expressed, then differential alterations should be observed in each mutant.

In a forebrain structure that was found to express only PER1, *i.e.* DMH, *Cry1* was rhythmically expressed in WT mice with a peak at ZT22 under *ad libitum* conditions (Figs. 4A and 6A, Table 2). In the DMH of *Per1^{-/-}* mutant mice, the amplitude of *Cry1* was decreased. Its expression was found to be significantly rhythmic in *Per2^{Brdm1}* mice (with a daily peak at ZT21), but not in *Per1^{-/-}* mutant mice (Fig. 6A). In accordance with PER1 expression detected in the DMH of WT mice, a major alteration of *Cry1* expression was found in that hypothalamic structure in *Per1* KO mice. Interestingly, the alterations observed in another PER1 expressing forebrain structure (*i.e.*, aPirC) were comparable to those described above for DMH (Supplemental Fig. 1). We also quantified *Dbp* expression in the DMH. No significant oscillation of *Dbp* was found in all genotypes. The mean level of *Dbp* was significantly reduced in *Per2^{Brdm1}* mice compared to WT and *Per1* KO animals (Figs. 4B and 6A).

In a forebrain structure expressing only PER2, *i.e.* PVN, *Cry1* expression profiles displayed similar apparent phases between WT and *Per1* KO mice (Figs. 4A and 6B, Table 2). According to the cosinor analysis, however, a daily rhythm was significant in WT mice only, with a peak at ZT20 under *ad libitum* conditions. Note that the shape of the daily profile of *Cry1* expression in the PVN of *Per1* mutant mice looks close to the control pattern, albeit with higher values (Fig. 6A). In accordance with the PER2 expression detected in the PVN of WT mice, the expression of *Cry1* was markedly altered in that hypothalamic nucleus in *Per2* mutant mice (Fig. 6B). Differential alterations were also noted in *Cry1* expression within the VMH of *Per2* mutant mice, compared to both WT and *Per1^{-/-}* mice (Supplemental Fig. 1). Concerning *Dbp* expression in the PVN, it was found to be rhythmic only in WT mice, and was down-regulated in *Per2* mutant mice (Figs. 4B and 6B).

In a forebrain structure expressing both PER1 and PER2 such as PVT, *Cry1* profiles were quite different between genotypes, with a daily rhythm for WT and *Per2* mutant mice peaking respectively at ZT15 and ZT23, and no significant rhythm for *Per1* KO mice (Fig. 6C, Table 2). In CA1 that also expresses both PER1 and PER2, no significant rhythm in *Cry1* expression was found in any genotype (Supplemental Fig. 1).

To sum up, in mice fed *ad libitum*, when a structure expressed either PER1 or PER2, alterations in *Cry1* expression could be observed in the corresponding mutant mice compared to WT littermates. By contrast, in structures expressing both proteins, differential alterations were observed in respective mutant mice.

Cry1 and Dbp expression in WT, Per1 KO and Per2^{Brdm1} mutant mice challenged with HF

We challenged WT, *Per1* KO and *Per2^{Brdm1}* mutant mice with HF that led to a significant loss of body mass compared to *ad libitum* feeding conditions (26.5±1.0 vs. 31.7±1.3 g, n=15; p<0.05) in WT as well as in *Per1* mutant (25.3±1.1 vs. 31.2±1.4 g, n=15; p<0.05) and *Per2* mutant mice (28.3±1.0 vs. 33.6±1.2 g, n=15; p<0.05). No significant difference in body mass was found between genotypes neither under *ad libitum* food, nor HF. We have previously reported that such a HF paradigm elicits a bout of food-anticipatory activity prior to mealtime in WT and *Per1* KO mice, while *Per2* mutant mice did not display food anticipation (Fig. 1). Similar results have been obtained in mice of the same genotypes, but challenged with a temporally restricted food access (Feillet et al., 2006).

Our second hypothesis was that different expression of PER1 or PER2 in the forebrain should result in differential adaptability of the clock components to nutritional cues. Thus, if PER1 or PER2 protein is expressed alone in a structure, then clock mechanisms should be impaired under HF in *Per1* KO mice or *Per2^{Brdm1}* mutant mice, respectively. If both proteins are expressed in a given cerebral region of WT animals, then differential alterations should be observed in each mutant. To test this, we investigated *Cry1* and *Dbp* expression in the forebrain in *Per* mutant mice under HF conditions.

In a structure that expresses only PER1, *i.e.* DMH, *Cry1* expression in WT mice was no longer rhythmic under HF conditions (Fig. 6D, Table 2). Moreover, *Cry1* profiles in the DMH were not found rhythmic in *Per1* nor *Per2* mutant mice (Fig. 6D). While flat in all genotypes, daily expression of *Dbp* was up-regulated in response to HF in WT and *Per1* mutant mice, but not in *Per2* mutant mice (Fig. 6D).

In a structure expressing only PER2, *i.e.* PVN, the daily profile of *Cry1* expression in WT mice exposed to HF was phase-advanced by 10 h (with a peak at ZT10) compared to conditions of food *ad libitum* (Figs. 4A and 5E, table 2). No significant rhythm of *Cry1* expression was detected in *Per1* KO mice or *Per2^{Brdm1}* mutant mice. Daily expression of *Dbp* in the PVN was found to be flat in all genotypes, albeit with lower mean values in *Per2^{Brdm1}* mutant mice compared to WT and *Per1* KO mice (Fig. 6E).

In a structure expressing both PER1 and PER2, such as PVT, profiles of *Cry1* were altered under HF in all genotypes (Figs. 4A and 6F), *Cry1* expression still showing a narrow but non significant daily peak in WT animals, whereas no rhythm at all could be detected in both mutants (Fig. 6F, Table 2). Daily expression of *Dbp* in the PVT was found to be flat in WT and *Per1* KO mice, but rhythmic in *Per2* mutant mice (Fig. 6F). The mean values of *Dbp* mRNAs in *Per2^{Brdm1}* mutant mice were lower compared to WT and *Per1* KO mice (Table 2).

To sum up, there are distinct changes of PER1 and PER2 expression in various forebrain areas of mice challenged with HF. Their differential expression was generally mirrored in the response of *Cry1* expression in *Per* mutant mice under HF. In structures that express only PER1 or PER2 in WT animals, *Cry1* expression was altered respectively in *Per1* KO or *Per2^{Brdm1}* mice challenged with HF. In structures that express both PER1 and PER2 in WT mice and were sensitive to nutritional cues (*i.e.*, PVT), HF-induced changes can be modified in both *Per1* KO and *Per2^{Brdm1}* mice.

Discussion

The present study investigated the expression patterns of PER1 and PER2 in the forebrain of mice. The main findings are that PER1 and PER2 are not equally expressed throughout the forebrain of mice with food *ad libitum*. When a structure expresses either PER1 or PER2, alterations in *Cry1* expression can be observed in the corresponding *Per1* or *Per2* mutant mice compared to WT littermates. Moreover, forebrain oscillators expressing PER1 and/or PER2 are differentially sensitive to nutritional cues mediated by daily hypocaloric feeding

(HF). Altered responses of *Cry1* expression were observed in respective *Per1* or *Per2* mutant mice challenged with HF.

Circadian oscillations in the forebrain of mice fed ad libitum

A number of extra-SCN oscillators have been identified in the mammalian forebrain (Rev. in [Guilding and Piggins, 2007](#)). Here we found that PER1 immunoreactivity (IR) is observed alone in the DMH, aPirC and dST, and concomitant with PER2 in the PVT, CA1, DG, CEA and Arc. PER2 IR alone is detected in the PVN, BLA and VMH ([Fig. 7](#)). Previous observations have shown a differential expression of *Per1* and *Per2* genes in the forebrain of rodents ([Yamamoto et al., 2001](#); [Matsui et al., 2005](#); [Shieh et al., 2005](#)). Nonetheless, some discrepancies exist between these studies and ours: *Per1* expression was detected in the PVN and VMH ([Yamamoto et al., 2001](#); [Matsui et al., 2005](#)), whereas we found no PER1 IR in those areas. Conversely, faint *Per2* expression was observed in the aPirC ([Matsui et al., 2005](#); [Shieh et al., 2005](#)) and we could not detect PER2 expression in that structure. We did not observe PER1 IR in the PVN, a result consistent with a previous study ([Hastings et al., 1999](#)). Post-transcriptional mechanisms can account for the differences observed; for instance, it is possible that *Per* genes are transcribed, but not translated. Alternatively, a number of post-translational modifications of PER1 or PER2 have been characterized ([Gallego and Virshup, 2007](#); [Nishii et al., 2006](#)). Therefore, we cannot fully exclude that post-translational changes that would be specific to certain forebrain oscillators may impair respective binding of the antibodies to PER1 or PER2 used here, preventing immunoreactive signals in those structures. Moreover, in addition to the circadian control of CLOCK-BMAL1 described in introduction, fine-tune regulation of *Per1* (e.g., by glucocorticoids; [Yamamoto et al., 2005](#)) and *Per2* (e.g., by heat shock proteins or acute temperature changes; [Kornmann et al., 2007](#)) may also account for differential expression of these genes in various cerebral oscillators. Nevertheless, our data on daily patterns of PER2 expression in the BLA and DG in mice fed *ad libitum* are consistent with previous results obtained in rats ([Lamont et al., 2005](#); [Waddington-Lamont et al., 2007](#)). Compared to the PER2 peak observed around ZT12 in the CEA of rats ([Lamont et al., 2005](#)) however, maximal expression of PER2 in the CEA occurs later (i.e., ZT20) in mice fed *ad libitum*.

Thus, forebrain oscillators in mice may not need both PER proteins to keep their clockwork going. In addition, there may be oscillators ticking with different clock hands, depending on their function. This suggests that the PER proteins may have different functions when entering in a clock mechanism. Genes coding for nuclear orphan receptors (ROR), other members of the feedback loops underlying central and peripheral clocks functioning, were found to be unevenly expressed in various peripheral tissues. In that respect, the possibility of differential function for those genes has been evoked ([Guillaumond et al., 2005](#)).

As a phase marker of circadian oscillations, we analyzed expression of a clock gene, namely *Cry1*, in the forebrain of WT mice of the C57BL6×129Sv strain. In the PVN, PVT and DMH, the highest levels of *Cry1* were observed at night, while those of *Dbp*, a clock-controlled gene, were observed a few hours earlier (except for DMH in which *Dbp* is not cycling), following comparable phase-relationships in expression of the two genes within the SCN clock ([Okamura et al., 1999](#); [Yan et al., 2000](#)).

To reinforce our point on a differential expression of PER1 and PER2 in the forebrain of mice fed *ad libitum*, we tested the first hypothesis that if a structure expresses PER1 and/or PER2, then alterations in clock mechanisms should be observed in respective mutants. We actually confirmed this hypothesis by assessing *Cry1* expression in the forebrain of WT, *Per1* KO and *Per2* mutant mice. Consistently, compared to WT littermates, the pattern of *Cry1* mRNA was altered in *Per1* KO mice in those structures that normally express PER1 (i.e., DMH or PVT) in WT mice. The same observation was made in *Per2* mutant mice in those structures that

normally express PER2 (*i.e.*, PVN or PVT) in WT animals. Previous findings for altered patterns of *Cry1* and *Dbp* expression in the SCN clock of these mutant mice also fit with these assumptions (Feillet et al., 2006).

Circadian oscillations in the forebrain of mice fed with a hypocaloric diet

It has been well documented that restricted feeding affects clock gene expression in peripheral tissues and various brain structures (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001; Lamont et al., 2005; Angeles-Castellanos et al., 2007; Waddington-Lamont et al., 2007). In the present study, mice were challenged with HF during daytime to assess modifications of daily expression of PER1 and PER2 in the forebrain. Interestingly, daily patterns of PER proteins differentially responded to HF depending on the area considered (Fig. 7). This indicates changes in phase-relationships between various forebrain regions under HF compared to *ad libitum* feeding, suggesting a central dissociation in the rhythms of cerebral regions responding or not to nutritional cues.

In BLA, consistent with our observation in mice fed with HF, PER2 expression has been shown to be transiently decreased at dark-light transition in rats exposed to daytime restricted feeding (Waddington-Lamont et al., 2007). This modest effect together with the lack of shift suggest that BLA is relatively impervious to feeding cues.

In CA1 and DG, HF produced a phase-advance of PER1 IR in keeping with previous studies on *Per1* mRNA (Wakamatsu et al., 2001) as well as on PER1 levels in food-restricted rats (Angeles-Castellanos et al., 2007). This shifting effect (3 h) for PER1 expression differs from what can be observed in other forebrain regions sensitive to HF, in which PER1 is up-regulated, but not shifted (see below). The amplitude of PER2 expression in DG had been demonstrated to be reduced by restricted feeding (Waddington-Lamont et al., 2007), but no difference in phase was detected in accordance with our observation. Lesions of the hippocampus do not impair expression of food-driven behaviours, such as food-anticipatory activity, elicited by restricted access to food, reinforcing the hypothesis that the hippocampus does not play a key role in food synchronization mechanisms (Mistlberger and Mumby, 1992). This finding fits with the relative insensitivity to HF of this brain region concerning PER2 expression and to some extent PER1. It is of note that in the SCN of mice challenged with HF, PER1 expression is phase-advanced, while PER2 is up-regulated compared to the *ad libitum* condition (Mendoza et al., 2007). Also, in the SCN of mice fed with HF, *Cry1* expression instead of being phase-changed is up-regulated not only in WT, but also in *Per1* and *Per2* mutant mice (Feillet et al., 2006). It is possible that the hippocampus and BLA remain phase-locked to the SCN and/or the light-dark cycle under HF.

Apart from the hippocampus, BLA and aPirC, all the other forebrain structures quantified here were highly sensitive to HF signals, leading to major modifications of daily patterns of PER1 and PER2 IR: PER1 was generally up-regulated and PER2 is always phase-advanced in response to HF (Fig. 7). For instance, in CEA, the amplitude of PER1 expression appears to be increased in HF mice, as previously observed in food-restricted rats (Angeles-Castellanos et al., 2007), whereas PER2 pattern was phase-advanced by HF (this study) and restricted feeding as well (Waddington-Lamont et al., 2007). Similar effects on the amplitude of PER1 oscillations were noted for DMH, PVT and Arc, and comparable shifting responses of PER2 were detected for PVN, PVT, Arc and VMH. These different responses to HF considering PER1 or PER2 are in agreement with our first hypothesis about differential function of PER1 and PER2 in the forebrain of mice fed *ad libitum*. PER2 may be essential for adaptability to variations in feeding cues, whereas PER1 may potentiate or increase reactivity to those cues, without being critical for adaptability *per se*. This hypothesis is supported by the recent finding that *Per2* is critical for the expression of food-driven behaviours, whereas *Per1* is dispensable (Feillet et al., 2006). Therefore, most forebrain oscillators expressing PER2

would be directly implicated in adaptation to nutritional cues. An example supporting this differential role of PER1 and PER2 is aPirC, the primary olfactory cortex. Ablation of the olfactory bulbs does not abolish food-anticipatory activity (Davidson et al., 2001), indicating that olfactory information is not essential for meal anticipation. It is probable though that it can reinforce feeding cues. Here we find that aPirC expresses PER1 only and is affected by HF. So it would convey information about food to other area expressing PER2, the synchronization of which would be in turn reinforced.

The DMH had been previously demonstrated to show a *de novo* expression of *Per1* and *Per2* mRNA under restricted feeding (Mieda et al., 2006). Moreover, expression of PER2 has been described in the DMH of food-restricted rats (Verwey et al., 2007). Even if we could detect altered patterns of PER1 under HF, no sizeable expression of PER2 in that structure could be seen in any condition. Thus, in the DMH of mice, *Per2* mRNA may actually be transcribed, but not translated. The DMH had been hypothesized to host a putative food-entrainable oscillator controlling food-anticipatory activity. Note however that lesions of the DMH either almost abolish (Gooley et al., 2006) or do not affect (Landry et al., 2006) expression of food-anticipatory activity. Considering that the DMH do not express PER2 in mice while *Per2* seems to be essential for food synchronization, we propose the DMH could be a major output of the food-entrainable oscillator rather than its actual site.

In WT (C57BL×129Sv) mice challenged with HF, *Cry1* expression in the PVN was phase-advanced by 10 h compared to conditions of food *ad libitum*. This shifting effect fits well with the 9-h phase-advance of PER2 oscillation observed for the same structure in mice of another strain (C3H) also fed with HF during daytime (present study). In other structures such as DMH and PVT, *Cry1* mRNA levels were no longer rhythmic in calorie-restricted mice, precluding assessment of phase-shifts. Furthermore, *Dbp* expression in WT mice was down-regulated in the DMH, PVN and PVT in response to HF.

In all structures quantified, compared to WT littermates, the pattern of *Cry1* expression in response to HF was altered in *Per1* KO and/or *Per2* mutant mice in structures normally expressing PER1 and/or PER2 in WT mice. In the Arc, a region implicated in the regulation of energy metabolism and food intake (Williams et al., 2000), this feature was confirmed under HF only, suggesting that PERs may not be implicated in the Arc functioning under *ad libitum* conditions. Nevertheless, the Arc seem to be essential for adaptability to restricted feeding. HF induces changes in local cerebral metabolic rate for glucose (LCMRglc) during food-anticipatory activity in the Arc of rats (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). Under *ad libitum* feeding, this area would be synchronized by the SCN and nocturnal feeding, whereas daytime restricted feeding may trigger temporal processes in that area.

The PVT is considered as a relay between circadian and limbic systems (Peng and Bentivoglio, 2004) and mediates the entrainment of the SCN to a palatable meal (Mendoza et al., 2005a), suggesting a role in the regulation of food-anticipatory activity (Nakahara et al., 2004). The LCMRglc increase in the PVT of food-restricted rats fits with this hypothesis (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). Even if PVT lesion does not impair food-anticipatory activity (Landry et al., 2007), our results clearly demonstrate its sensitivity to feeding cues.

As mentioned above, no PER1 IR was detected in the PVN under *ad libitum* conditions (Hastings et al., 1999). The PVN play an important role in feeding behaviour (Sahu, 2004). Moreover, expression of clock genes and c-FOS in this region is altered during restricted feeding (Wakamatsu et al., 2001; Angeles-Castellanos et al., 2004). LCMRglc in the PVN was found to be specifically affected during food-anticipatory activity in HF rats (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). According to our second hypothesis, as the PVN synthesize PER2 whose expression pattern is altered under HF, it may contribute to food-driven behaviours.

Also expressing PER2 only, the VMH are involved in the regulation of energy metabolism and feeding behaviour (Pénicaud et al., 1983). In particular, they play a role in sensing

hypoglycaemia (Yang et al., 1999). Chemical lesions of the VMH reduce behavioural phase changes induced by HF (Challet et al., 1997). Therefore, the VMH can be directly synchronized by feeding cues and in turn influence physiological responses.

In conclusion, our study reveals a differential expression of PER1 and PER2 in the forebrain of mice. Differences of expression may originate in a differential role for both proteins, as respective mutants show altered patterns of *Cry1* expression in *ad libitum* and HF conditions. It reinforces the growing hypothesis that there is not one single clock, but a system of multiple brain oscillators (Roenneberg and Merrow, 2003; Guilding and Piggins, 2007) ticking with different clock hands and differentially sensitive to nutritional cues. It would be interesting to distinguish between motivational and metabolic responses to hypocaloric feeding and their interpretation in each forebrain region. Additional studies by means of real-time reporters and local knock-in or knock-out will reveal the actual function of coupling and/or synchronization between forebrain oscillators.

Experimental Methods

Animals and housing

Adult male C3H mice (Charles River, Lyon, France) were used for PER1 and PER2 expression analysis. Adult male and female F₂ homozygous *Per1* and *Per2* mutant mice and their Wild Type (WT) C57BL/6×129SvEvBrd littermates were used for *Cry1* and *Dbp* mRNA expression analysis. The loss-of-function *Per1* mutation (*Per1*^{-/-}) results from deletion of exon 3 to exon 19 of *mPer1*. The deleted region includes the PAS domain, thus precluding protein dimerization. The *Per2* mutation (*Per2*^{Brdm1}) was obtained by deleting part of the PAS domain, thus impairing normal protein dimerization. The *Per1*^{-/-} and *Per2*^{Brdm1} mutations are described in detail in Zheng et al. (2001) and Zheng et al. (1999), respectively. All animals were housed singly in cages equipped with a running wheel in a room at 23 ± 1°C under a 12/12 light-dark cycle (LD light 200 lux; darkness 0 lux). Under these lighting conditions, times of day were converted to Zeitgeber times (ZT) in which ZT0 and ZT12 were the onsets of light and darkness, respectively. Food and water were available *ad libitum* unless otherwise stated.

The two experiments were performed in accordance with the *Principles of Laboratory Animal Care* (national institute of Health publication 86-23, revised 1985) and the French national Laws.

The two experiments of the present study were carried out in two strains of mice: C3H and C57BL6×129Sv. Circadian differences in mouse strains have been clearly characterized in terms of endogenous period and shifting responses to light (Hofstetter et al., 1995; Schwartz and Zimmerman, 1990). However, the endogenous period is similar in both strains (tau_{C3H}=23.8 h, see Mendoza et al., 2005b; tau_{C57BL6×129Sv}=23.7 h, see Zheng et al. 1999; 2001), as are their circadian responses to light (for C3H, see Mendoza et al., 2005b; for C57BL6×129Sv, see Albrecht et al., 2001). Thus, except for possible differences in melatonin secretion, we consider that the circadian timing system is comparable in the two strains of mice studied here.

In contrast to temporally restricted feeding paradigms, that do not reduce calorie intake and that allow enough food to be eaten daily, hypocaloric feeding is known to lead to several beneficial physiological actions, such as slowing of ageing, extended lifespan, delayed onset of major age-related diseases in a number of species, including rodents and primates (Hyun et al., 2006; Wolf, 2006). In mice under a light/dark cycle, a daily hypocaloric feeding (*i.e.*, 66% of animal's daily food intake given each day at the same time), but not temporally restricted feeding, leads to phase advances of behavioural and physiological circadian rhythms

controlled by the SCN, whatever the feeding time over the daily cycle (Challet et al., 1998; Mendoza et al., 2005b).

Experimental design for immunohistochemistry

C3H mice were randomly divided into two groups: a group of mice fed *ad libitum* (AL) with a mean spontaneous food intake of 4.6 ± 0.04 g and a HF group which was given 66% (*i.e.*, 3.0 ± 0.02 g) of the daily food intake at midday (*i.e.*, ZT6). Under HF conditions, mice eat their diet in the first 3 h after food is provided (Mendoza et al., 2005b). If an animal lost more than 20% of its initial body mass, it was refeed accordingly. Three weeks later, *ad libitum* and HF mice were killed and brains were removed for immunohistochemistry. Sampling was performed at six temporal points with 4 h intervals (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 and ZT20) over a 24 h cycle ($n = 4$, per temporal point).

At the selected intervals, animals were killed with an isoflurane overdose and perfused transcardially with 50 ml of 0.9% saline followed by 50 ml of cold 4% paraformaldehyde in 0.1-M phosphate buffer (PB; pH 7.4). Brains were removed, post-fixed (overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C) and transferred to cryoprotectant buffered sucrose solution (30%) for 72 h at 4 °C. Brains were then frozen in isopentane at -60 °C and stored at -80 °C. Serial coronal sections (30- μ m) through forebrain structures were prepared on a cryostat at -20°C and collected in 0.1-M phosphate-buffered saline (PBS). Free-floating sections were washed in cold 50-mM Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4; Sigma, St Louis, MO) and incubated in a solution of 3% of H₂O₂ (Sigma) in TBS for 30 min at room temperature. Brain sections were then rinsed in TBS, and incubated for 2 hr in a blocking solution in 3% normal horse or goat serum and 5% bovine serum albumine (BSA) in TBS with 0.1% Triton X-100 (0.1% TBS-X), followed by 48 h incubation in the primary antibody (in 0.1% TBS-X and horse or goat serum) at 4°C. We used a goat polyclonal anti-PER1 antibody (1:2000, raised against an epitope mapping the N-terminus of human *Per1*; SC-7724, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA), and a rabbit polyclonal anti-PER2 (1:1000, affinity purified raised against an epitope mapping the C-terminus of mouse *Per2*, Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX). Following incubation in the primary antibody, sections were rinsed in TBS-X and incubated for 2 h at 4°C with a biotinylated anti-rabbit IgG made in goat or anti-goat IgG made in horse (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:500 with 0.1% TBS-X. Following incubation with secondary antibody, sections were rinsed in TBS-X and incubated for 1 h at room temperature with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Standard Elite ABC Kit, Vector Laboratories). Then sections were rinsed two times for 10 min in TBS, and incubated with 0.025% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) with 0.01% H₂O₂ in 50-mM Tris buffer. After this final incubation, sections were rinsed with TBS, wet-mounted onto gel-coated slides, dehydrated through a series of alcohols, soaked in xylene, and coverslipped. The specificity of antibodies was established in mouse brain by preadsorption control experiments. Antibody binding to antigen was blocked by adding the PER1 or PER2 peptides (PER1, sc-7724-P Santa Cruz Biotechnology; PER2 blocking peptide, Alpha Diagnostic International; 1 mg/ml, both diluted 1:100) to the primary incubation solution. The addition of each peptide prevented PER1 and/or PER2 immunostaining (Supplemental Fig. 2).

Sections were viewed using a monitoring CCD video camera with Viewfinder Lite software coupled to a microscope (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France). For the image analysis we used NIH ImageJ software (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD). For each section, background intensity of staining was determined in an adjacent region devoid of immunoreactive signals. Immunopositive cells were considered positive when their immunostaining exceeded twice the intensity of threshold background. The mean number of immunoreactive nuclei were counted by a researcher blind to the treatment (feeding condition and time) in the dorsal striatum (dST), paraventricular nucleus of the thalamus (PVT),

paraventricular nuclei of the hypothalamus (PVN), anterior piriform cortex (aPirC), dorsomedial nuclei of the hypothalamus (DMH), ventromedial nuclei of the hypothalamus (VMH), arcuate nuclei (Arc), hippocampus (Ammon's Horn: CA1 and dentate gyrus: DG) and central (CEA) and basolateral amygdala (BLA) (2-3 sections/level/animal).

Experimental design for in situ hybridization

Daily food intake of WT, *Per1* and *Per2* mutant mice was determined during 2 weeks of baseline with food *ad libitum*. Mice and food were weighed every week. After the baseline period mice were randomly assigned to an *ad libitum* fed group or to a hypocaloric diet group (HF group), *i.e.* they were provided 66% of their initial intake close to midday (ZT4) during the following 3 weeks. After 3 weeks of food restriction, mice of each genotype under *ad libitum* or HF conditions were sacrificed. Sampling was performed at 4 temporal points with 6-h intervals (ZT2, ZT8, ZT14 and ZT20) over a 24 h cycle ($n = 4$ per temporal point per genotype).

Antisense and sense RNA probes were generated with an *in vitro* transcription kit (Maxiscript, Ambion, TX). Here we used a riboprobe for *mCry1* (GenBank accession number AF156986) and *mDbp* (GenBank accession number NM016974). *Cry1* was chosen as phase marker because its rhythmic expression is known to be more reliable than that of other clock genes such as *Cry2*, for example (Kume et al., 1999; Okamura et al., 1999). *mDbp* is a clock-controlled gene coding for a transcription factor called albumin D-site binding protein (DBP) whose transcription shows robust daily oscillations in the SCN (Lopez-Molina et al., 1997; Yan et al., 2000).

Forebrain sections (14- μ m thick) were fixed in 4 % phosphate-buffered paraformaldehyde, rinsed twice with PBS, and then acetylated twice in 0.1 M triethanol-amine, washed again with PBS, and dehydrated in a graded ethanol series. Sections were hybridized overnight with either denatured antisense or sense riboprobe in a humid chamber at 54 °C. Sections were then rinsed with saline sodium citrate, treated with ribonuclease A (Sigma), rinsed with stringency washes of saline sodium citrate, and dehydrated in a graded ethanol series. Slices and radioactive standards were exposed for one week to an autoradiographic film (Biomax MS-1 Kodak, Sigma). Standards were included in each cassette to verify that the measured values of optical densities were in the linear response range of the film. Densitometric analysis of hybridization signals was performed using ImageJ (NIH) by a researcher blind to the feeding condition, time point, and genotype. Before densitometric measures, each forebrain region was first identified on an adjacent section stained with cresyl violet. The optical density of specific signal was calculated by subtracting the intensity of staining background area (defined as a circle of 100 μ m diameter) measured in the corpus callosum from that of a circle of 100 μ m diameter measured in various forebrain areas (aPirC, PVT, CA1, DMH, VMH, Arc, PVN for *Cry1* and PVT, DMH and PVN for *Dbp*). Measures were made bilaterally (for paired structures) on three slices for each structure and averaged for a given brain. Data were expressed as relative optical density values.

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SEM. The daily patterns of proteins or genes expression were fitted by a non-linear least-squares regression (SigmaPlot software, Jandel Scientific, Chicago, USA). The fitting equation (cosinor) was:

$$y = [A + B \cdot \cos (2\pi \cdot (t - C) / 24)]$$

where y is the level of mRNA, A the mean level, B the amplitude of mRNA oscillation, C the acrophase of mRNA oscillation, and t the time (h). Only significant best-fit parameters ($p < 0.05$) were included in this study.

Unpaired Student's *t*-test was used for comparisons of mean level, amplitude and acrophase between AL and HF groups in a given structure for a given genotype. One-way analysis of variance was used to for comparisons of mean level, amplitude and acrophase in a given structure between WT, Per1 KO and Per2^{Brdm1} mutant mice. Post-hoc comparisons were performed with Tukey's test (SigmaStat, Jandel Scientific). The first data points were double-plotted on the figures but were not taken into account for statistical analysis.

Acknowledgments:

We thank Dr. Françoise Eclancher for helpful comments on the manuscript and Dr. Hugues Dardente for providing *CryI* clone.

References

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., Block, G.D., 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22, 350-356.
- Albrecht, U., 2004. The mammalian circadian clock: a network of gene expression. *Front. Biosci.* 9, 48-55.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G., 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., Lee, C.C., 2001. mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 16, 100-104.
- Amir, S., Lamont, E.W., Robinson, B., Stewart, J., 2004. A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.* 24, 781-790.
- Angeles-Castellanos, M., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C., 2004. c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, 158-165.
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Escobar, C., 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience* 144, 344-355.
- Asai, M., Yoshinobu, Y., Kaneko, S., Mori, A., Nikaido, T., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S., 2001. Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J. Neurosci. Res.* 66, 1133-1139.
- Challet, E., Caldelas, I., Graff, C., Pévet, P., 2003. Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem.* 384, 711-719.
- Challet, E., Pévet, P., Lakhdar-Ghazal, N., Malan, A., 1997. Ventromedial nuclei of the hypothalamus are involved in the phase advance of temperature and activity rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Brain Res. Bull.* 43, 209-218.
- Challet, E., Solberg, L.C., Turek, F.W., 1998. Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274, R1751-R1761.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950-2961.
- Davidson, A.J., Aragona, B.J., Werner, R.M., Schroeder, E., Smith, J.C., Stephan, F.K., 2001. Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiol. Behav.* 72, 231-235.
- Feillet, C.A., Ripperger, J.A., Magnone, M.C., Dulloo, A., Albrecht, U., Challet, E., 2006. Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. *Curr. Biol.* 16, 2016-2022.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M., 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.
- Gallego, M., Virshup, D.M., 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 139-148.
- Gooley, J.J., Schomer, A., Saper, C.B., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* 9, 398-407.
- Granados-Fuentes, D., Saxena, M.T., Prolo, L.M., Aton, S.J., Herzog, E.D., 2004. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur. J. Neurosci.* 19, 898-906.

- Guilding, C., Piggins, H.D., 2007. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J. Neurosci.* 25, 3195-3216.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., Cermakian, N., 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* 20, 391-403.
- Hastings, M.H., Field, M.D., Maywood, E.S., Weaver, D.R., 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, RC11.
- Hofstetter, J.R., Mayeda, A.R., Possidente, B., Nurnberger, J.I., 1995. Quantitative trait loci (QTL) for circadian rhythms of locomotor activity in mice. *Behav. Genet.* 25, 545-556.
- Hyun, D.H., Emerson, S.S., Jo, D.G., Mattson, M.P., de Cabo, R., 2006. Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19908-19912.
- Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15, 271-277.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S., Schibler, U., 2007. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* 2007, e34.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.
- Lamont, E.W., Robinson, B., Stewart, J., Amir, S., 2005. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4180-4184.
- Landry, G.J., Simon, M.M., Webb, I.C., Mistlberger, R.E., 2006. Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, 1527-1534.
- Landry, G.J., Yamakawa, G.R.S., Mistlberger, R.E., 2007. Robust food anticipatory circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 1141, 108-118.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., Schibler, U., 1997. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* 16, 6762-6771.
- Matsui, D., Takekida, S., Okamura, H., 2005. Molecular oscillation of Per1 and Per2 genes in the rodent brain: an in situ hybridization and molecular biological study. *Kobe J. Med. Sci.* 51, 85-93.
- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M., Escobar, C., 2005a. A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2855-2862.
- Mendoza, J., Graff, C., Dardente, H., Pévet, P., Challet, E., 2005b. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J. Neurosci.* 25, 1514-1522.
- Mendoza, J., Pévet, P., Challet, E., 2007. Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3691-3701 .
- Mieda, M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Tanaka, K., Yanagisawa, M., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12150-12155.

- Mistlberger, R.E., Mumby, D.G. 1992. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav. Brain Res.* 47, 159-168.
- Mistlberger, R.E., 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18, 171-195.
- Nakahara, K., Fukui, K., Murakami, N., 2004. Involvement of thalamic paraventricular nucleus in the anticipatory reaction under food restriction in the rat. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1297-300.
- Nishii, K., Yamanaka, I., Yasuda, M., Kiyohara, Y.B., Kitayama, Y., Kondo, T., Yagita, K., 2006. Rhythmic post-transcriptional regulation of the circadian clock protein mPER2 in mammalian cells: a real-time analysis. *Neurosci. Lett.* 401, 44-48.
- Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J.H., van der Horst, G.T., 1999. Photic induction of mPer1 and mPer2 in *Cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286, 2531-2534.
- Peng, Z.C., Bentivoglio, M., 2004. The thalamic paraventricular nucleus relays information from the suprachiasmatic nucleus to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat at the light and electron microscopic levels. *J. Neurocytol.* 33, 101-116.
- Pénicaud, L., Larue-Achagiotis, C., Le Magnen, J., 1983. Endocrine basis for weight gain after fasting or VMH lesion in rats. *Am. J. Physiol.* 245, 246-252.
- Pereira de Vasconcelos, A., Bartol-Munier, I., Feillet, C.A., Gourmelen, S., Pevet, P., Challet, E., 2006. Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food-anticipatory activity. *Neuroscience* 139, 741-748.
- Roenneberg, T., Merrow, M. 2003. The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13, R198-R207.
- Sahu, A. 2004. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145, 2613-2620.
- Schwartz, W.J., Zimmerman, P., 1990. Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J. Neurosci.* 10, 3685-3694.
- Shieh, K.R., Yang, S.C., Lu, X.Y., Akil, H., Watson, S.J., 2005. Diurnal rhythmic expression of the rhythm-related genes, *rPeriod1*, *rPeriod2*, and *rClock*, in the rat brain. *J. Biomed. Sci.* 12, 209-217.
- Stephan, F.K., 2001. Food-entrainable oscillators in mammals. In: Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (Eds), *Circadian clocks, Handbook of behavioural neurobiology* Vol. 12, Kluwer Academic/Plenum, New York, NY, pp. 223-246.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490-493.
- Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y., 2001. *Circadian clocks, Handbook of behavioural neurobiology* Vol. 12, Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Verwey, M., Khoja, Z., Stewart, J., Amir, S., 2007. Differential regulation of the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience* 147, 277-285.
- Waddington-Lamont, E., Harbour, V.L., Barry-Shaw, J., Renteria-Diaz, L., Robinson, B., Stewart, J., Amir, S., 2007. Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain. *Neuroscience* 144, 402-411.
- Wakamatsu, H., Yoshinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S., 2001. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift

- of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1190-1196.
- Williams, G., Harrold, J.A., Cutler, D.J., 2000. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 385-396.
- Wolf, G., 2006. Calorie restriction increases life span: a molecular mechanism. *Nutr. Rev.* 64, 89-92.
- Yamamoto, S., Shigeyoshi, Y., Ishida, Y., Fukuyama, T., Yamaguchi, S., Yagita, K., Moriya, T., Shibata, S., Takashima, N., Okamura, H., 2001. Expression of the Per1 gene in the hamster: brain atlas and circadian characteristics in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 430, 518-532.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamine, T., Takumi, T., 2005. Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* 280, 42036-42043.
- Yan, L., Miyake, S., Okamura, H., 2000. Distribution and circadian expression of dbp in SCN and extra-SCN areas in the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 59, 291-295.
- Yang, X.J., Kow, L.M., Funabashi, T., Mobbs, C.V., 1999. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48, 1763-1772.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A., Lee, C.C., 2001. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105, 683-694.
- Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., Bradley, A., 1999. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400, 169-173.

Figure legends

Fig. 1. Daily wheel-running activity in mice fed *ad libitum* for 10 days and submitted to hypocaloric feeding (arrows) during 3 wks (A, Wild-type C3H mouse; B, Wild-type C57BL×129Sv mouse; C, *Per1*^{-/-} mouse; and D, *Per2*^{Brbm1} mouse). Locomotor activity is plotted as an actogram with each horizontal line corresponding to two consecutive days and with the second day being double-plotted on the next line. Nighttime is indicated by black bar on top abscissa.

Fig. 2. PER1-immunoreactive cells (left panels, A) in the dorsomedial nuclei of the hypothalamus (DMH; upper left panels), Ammon's horn (CA1; middle left panels) and arcuate nuclei (Arc; lower left panels) and PER2-immunoreactive cells (right panels, B) in the ventromedial nuclei of the hypothalamus (VMH; upper right panels), Ammon's horn (CA1; middle right panels) and arcuate nuclei (Arc; lower right panels). For each structure, feeding conditions are either food *ad libitum* (left) or hypocaloric feeding (right). 3V, third ventricle; ME, median eminence. Data correspond to ZT8 in DMH, VMH and Arc, and ZT20 in CA1. Scale bar: 200 μ m.

Fig. 3. Daily profiles of PER1 (circles) and PER2 (diamonds) immunoreactive cells (mean \pm SEM) in specific forebrain regions of mice ($n = 4$ per group and time point) under food *ad libitum* (black symbols) or hypocaloric feeding (white symbols) conditions. Structures expressing PER1 only (A): anterior piriform cortex (aPirC) and dorsomedial nuclei of the hypothalamus (DMH); structures expressing PER2 only (B): ventromedial nuclei of the hypothalamus (VMH), paraventricular nuclei of the hypothalamus (PVN) and basolateral amygdala (BLA); structures expressing PER1 and PER2 (C): Ammon's horn (CA1), Central amygdala (CEA), paraventricular nucleus of the thalamus (PVT) and arcuate nuclei (Arc). The arrow above the X axis indicates time of feeding. Nighttime is indicated by a black bar on the X axis.

Fig. 4. Autoradiograms of *Cry1* (A) and *Dbp* expression (B) at different Zeitgeber times (ZT) in the paraventricular hypothalamic nuclei (PVN), suprachiasmatic nuclei (SCN) and paraventricular thalamic nucleus (PVT) in wild type (WT) mice under *ad libitum* (AL) or hypocaloric feeding (HF) conditions. Scale bar: 400 μ m.

Fig. 5. Autoradiograms of *Cry1* expression at Zeitgeber time (ZT) 14 in Ammon's horn (CA1), dentate gyrus (DG; top panels), dorsomedial nuclei of the hypothalamus (DMH), ventromedial nuclei of the hypothalamus (VMH) and arcuate nuclei (Arc; bottom panels), in wild type (WT), *Per1* mutant (*Per1*^{-/-}) and *Per2* mutant (*Per2*^{Brbm1}) mice under *ad libitum* (AL, left) or hypocaloric feeding (HF, right) conditions. Scale bar: 400 μ m.

Fig. 6. Daily expression of *Cry1* gene in the forebrain of mice under *ad libitum* (A, B and C) or hypocaloric feeding (D, E and F) conditions, as assessed by *in situ* hybridization. The dorsomedial nuclei of the hypothalamus (DMH) express PER1 only (A and D). The paraventricular nuclei of the hypothalamus (PVN) express PER2 only (B and E). The paraventricular nucleus of the thalamus (PVT) expresses both PER1 and PER2 (C and F). Wild type (WT; black circles, solid lines), *Per1* mutant (*Per1*^{-/-}; green squares, dashed lines) and *Per2* mutant (*Per2*^{Brbm1}; blue triangles, dotted lines) mice ($n=3-4$; means \pm SEM). Data for ZT2 were double-plotted. The arrow above the X axis indicates time of feeding. Nighttime is indicated by a black bar on the X axis.

Fig. 7. Schematic sagittal section of a mouse forebrain summarizing differential PER1 (orange) and PER2 (purple) immunoreactivity (IR) under food *ad libitum* and respective modifications in response to hypocaloric feeding. aPirC: anterior piriform cortex, Arc: arcuate nuclei of the hypothalamus, BLA: basolateral amygdala, CA1: Ammon's Horn, CEA: central amygdala, DG: dentate gyrus, DMH: dorsomedial nuclei of the hypothalamus, dST: dorsal striatum, PVN: paraventricular nuclei of the hypothalamus, PVT: paraventricular nucleus of the thalamus, SCN: suprachiasmatic nuclei (Data analyzed in [Mendoza et al., 2007](#)), VMH: ventromedial nuclei of the hypothalamus.

Supplemental Fig. 1. Daily expression of *Cry1* gene in the forebrain of mice under *ad libitum* (A, B and C) or hypocaloric feeding (D, E and F) conditions, as assessed by *in situ* hybridization.

A structure expressing PER1 only (A and D): anterior piriform cortex (aPirC); a structure expressing PER2 only (B and E): ventromedial nuclei of the hypothalamus (VMH); two structures expressing both PER1 and PER2 (C and F): Ammon's horn (CA1) and arcuate nuclei (Arc). Wild type (WT; circles, solid lines), *Per1* mutant (*Per1*^{-/-}; squares, dashed lines) and *Per2* mutant (*Per2*^{*Brbm1*}; triangles, dotted lines) mice (n=3-4; means ± SEM). Data for ZT2 were double-plotted. The arrow above the X axis indicates time of feeding. Nighttime is indicated by a black bar on the X axis.

Supplemental Fig. 2. Adsorption controls for antibodies specificity. For all experiments animals were sacrificed at Zeitgeber 12 with food *ad libitum*. Scale bar, 200µm
PVN: paraventricular nuclei of the hypothalamus, PVT: paraventricular nucleus of the thalamus.

Table 1. Characteristics of daily oscillations of PER1 and PER2 in the forebrain of mice fed *ad libitum* or challenged with hypocaloric feeding

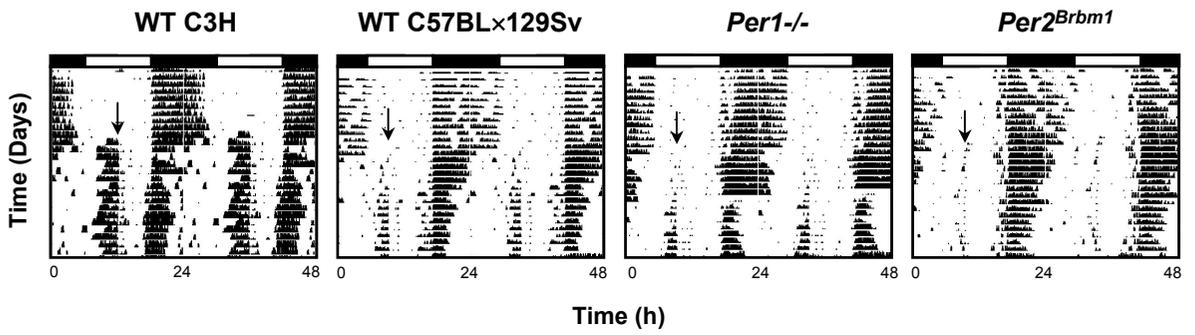
		Mean level (n cells)			Amplitude (n cells)			Acrophase (h)		
		AL	HF	comp.	AL	HF	comp.	AL	HF	comp.
Forebrain structures expressing PER1 only	aPirC PER1	193±9	198±12	=	85±12	61±17	=	17.2±0.6	13.6±1.0	+3h
	aPirC PER2	∅	∅		/	/		/	/	
	dST PER1	373±18	451±24	↑	58±24	231±34	↑	18.9±1.7	18.6±0.6	=
	dST PER2	∅	∅		/	/		/	/	
	DMH PER1	75±4	96±4	↑	34±6	59±5	↑	9.4±0.7	10.8±0.4	=
	DMH PER2	∅	∅		/	/		/	/	
Forebrain structures expressing PER2 only	BLA PER1	∅	∅		/	/		/	/	
	BLA PER2	114±7	102±10	=	61±10	/		21.7±0.6	/	
	PVN PER1	∅	∅		/	/		/	/	
	PVN PER2	90±8	91±8	=	45±11	35±11	=	15.3±0.9	6.6±1.2	+9h
	VMH PER1	∅	∅		/	/		/	/	
	VMH PER2	151±15	233±12	↑	100±21	120±17	=	14.7±0.8	7.5±0.5	+7h
Forebrain structures expressing PER1 and PER2	CA1 PER1	48±4	58±4	=	46±5	35±6	=	22.0±0.4	18.6±0.6	+3h
	CA1 PER2	44±7	43±6	=	66±9	54±8	=	22.0±0.5	22.0±0.6	=
	DG PER1	31±3	30±3	=	31±4	19±4	↓	22.1±0.4	18.8±0.7	+3h
	DG PER2	40±4	41±0	=	48±5	31±4	↓	22.9±0.4	21.9±0.5	=
	CEA PER1	95±13	167±11	↑	56±19	109±16	↑	14.3±1.3	16.1±0.6	=
	CEA PER2	111±4	120±5	=	13±6	15±8	=	18.3±1.9	12.0±2.0	+6h
	PVT PER1	142±8	222±8	↑	24±12	44±12	=	16.1±1.9	15.1±1.0	=
	PVT PER2	99±7	94±6	=	71±10	56±9	=	16.1±0.5	11.2±0.6	+5h
	Arc PER1	47±8	68±4	↑	47±12	40±5	=	12.7±0.9	11.0±0.5	=
	Arc PER2	99±10	117±8	=	45±14	56±11	=	18.9±1.2	10.1±0.7	+6h

AL, food *ad libitum*; HF, hypocaloric feeding; *comp.*, comparison between AL and HF; =, no significant difference ($p > 0.05$); ↑ significant increase ($p < 0.05$); ↓, significant decrease ($p < 0.05$); /, lack of significant parameter ($p > 0.05$) in the cosinor analysis; ∅, lack of immunoreactive signals above background intensity.

Table 2 Characteristics of daily oscillations of *Cry1* and *Dbp* mRNA in the forebrain of WT, *Per1*^{-/-} and *Per2*^{Brdm1} mutant mice fed *ad libitum* or challenged with hypocaloric feeding.

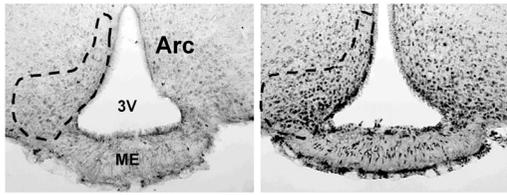
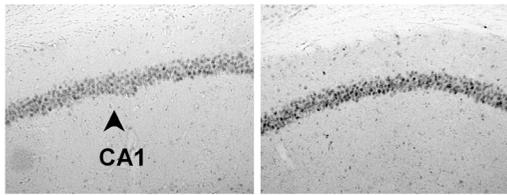
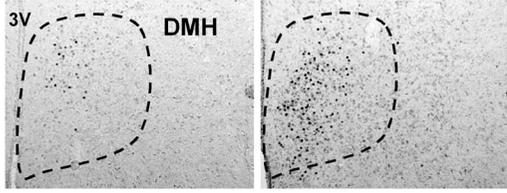
		Mean level (a.u.)			Amplitude (a.u.)			Acrophase (h)		
		AL	HF	comp.	AL	HF	comp.	AL	HF	comp.
DMH <i>Cry1</i>	WT	3.6±0.2 ^a	4.6±0.6 ^a	↑	0.8±0.3	/		21.6±1.7	/	
	<i>Per1</i> ^{-/-}	3.3±0.4 ^a	4.1±0.8 ^a	=	/	/		/	/	
	<i>Per2</i> ^{Brdm1}	2.9±0.2 ^a	4.2±0.5 ^a	↑	0.6±0.3	/		20.6±2.0	/	
PVN <i>Cry1</i>	WT	4.6±0.6 ^a	5.2±0.4 ^a	=	1.7±0.8	1.1±0.5	=	20.1±1.9	10.2±1.9	+10 h
	<i>Per1</i> ^{-/-}	6.6±0.6 ^b	5.4±0.6 ^a	=	/	/		/	/	
	<i>Per2</i> ^{Brdm1}	5.2±0.3 ^{ab}	5.6±0.7 ^a	=	/	/		/	/	
PVT <i>Cry1</i>	WT	6.8±0.8 ^a	4.7±0.7 ^a	=	3.1±1.1	/		/	/	
	<i>Per1</i> ^{-/-}	6.7±0.7 ^a	5.5±0.7 ^a	=	/	/		/	/	
	<i>Per2</i> ^{Brdm1}	6.5±0.7 ^a	5.4±0.6 ^a	=	2.3±0.7	/		/	/	
DMH <i>Dbp</i>	WT	11.3±1.6 ^a	6.7±0.8 ^{ab}	↓	/	/		/	/	
	<i>Per1</i> ^{-/-}	10.9±1.7 ^a	8.8±1.9 ^a	=	/	/		/	/	
	<i>Per2</i> ^{Brdm1}	5.7±0.9 ^b	4.4±1.5 ^b	=	/	/		/	/	
PVN <i>Dbp</i>	WT	7.6±0.7 ^a	7.9±0.7 ^a	=	3.1±0.9	/		9.1±1.2	/	
	<i>Per1</i> ^{-/-}	7.8±0.8 ^a	8.5±0.7 ^a	=	/	/		/	/	
	<i>Per2</i> ^{Brdm1}	4.8±0.5 ^b	4.0±0.4 ^b	=	/	/		/	/	
PVT <i>Dbp</i>	WT	8.6±0.5 ^{ab}	9.7±0.7 ^a	=	1.9±0.7	/		10.9±1.4	/	
	<i>Per1</i> ^{-/-}	10.1±0.6 ^a	10.7±1.1 ^a	=	/	/		/	/	
	<i>Per2</i> ^{Brdm1}	8.0±0.7 ^b	7.2±0.5 ^b	=	/	1.9±0.6		/	1.0±1.4	

AL, food *ad libitum*; HF, hypocaloric feeding; *comp.*, comparison between AL and HF; =, no significant difference ($p > 0.05$); ↑, significant increase ($p < 0.05$); ↓, significant decrease ($p < 0.05$); /, lack of significant parameter ($p > 0.05$) in the cosinor analysis. For a given feeding condition (AL or HF) in a given forebrain structure, means lacking common superscripts are significantly different ($p < 0.05$). DMH, PVN and PVT were chosen as examples of forebrain structures expressing only PER1, only PER2 or both PER1 and PER2, respectively.



Revised Fig. 1

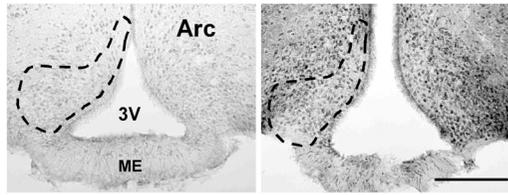
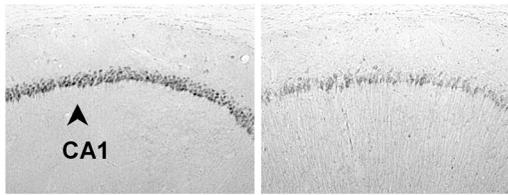
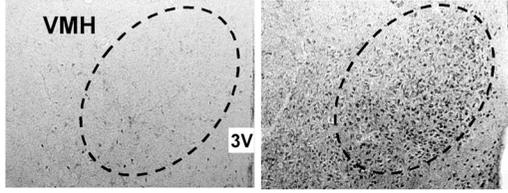
A. PER1



Ad libitum

Hypocaloric feeding

B. PER2

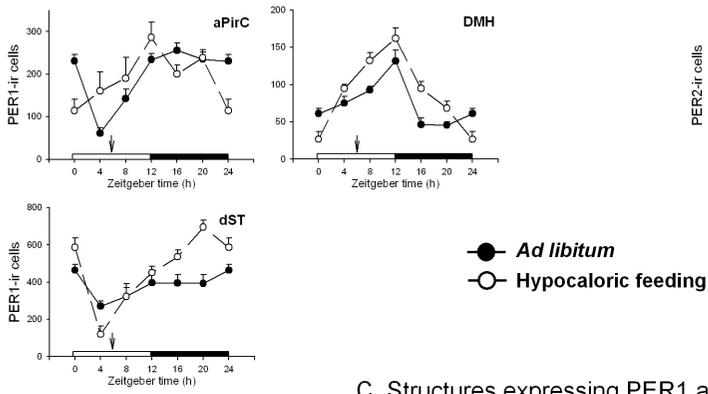


Ad libitum

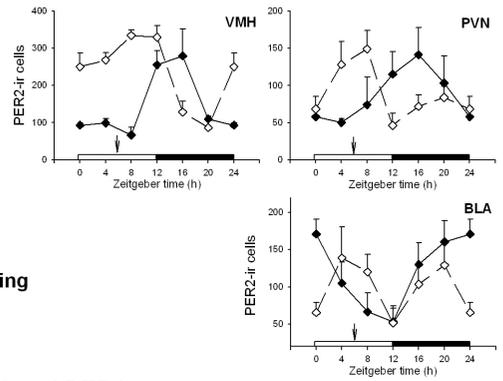
Hypocaloric feeding

Revised Fig. 2

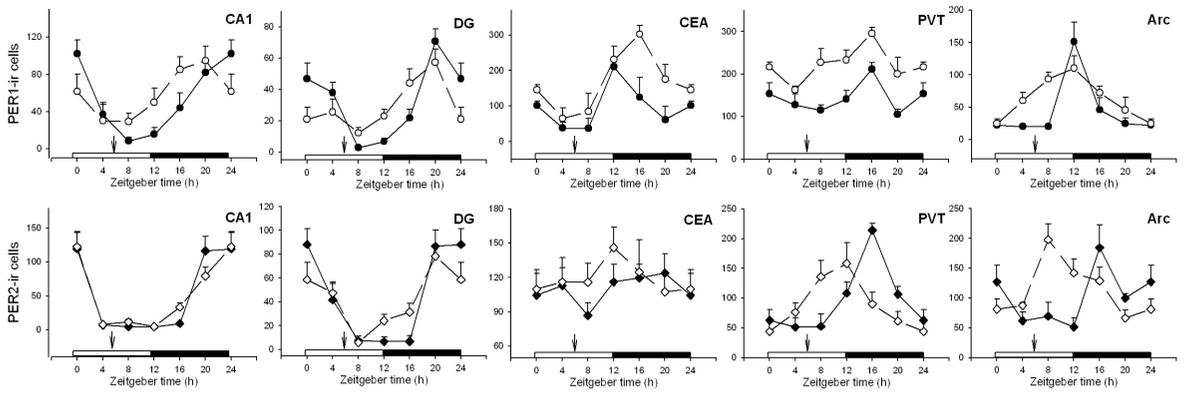
A. Structures expressing PER1

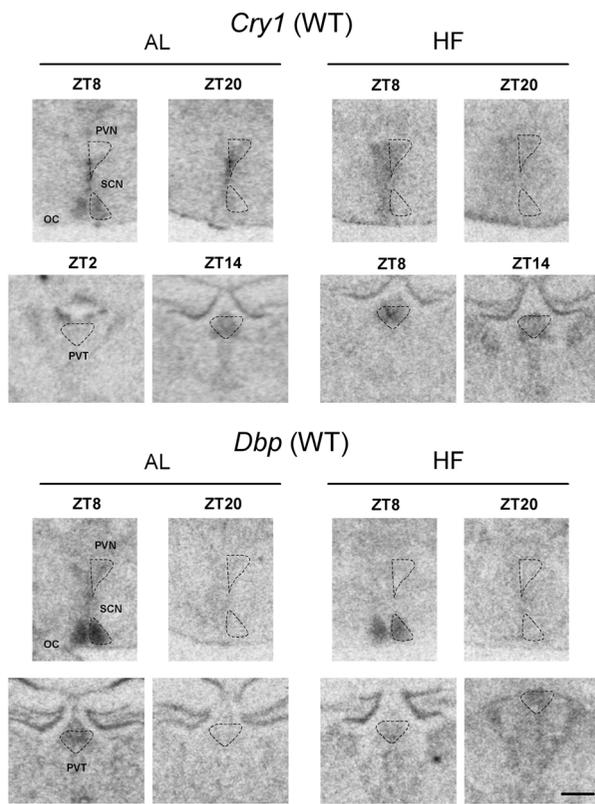


B. Structures expressing PER2

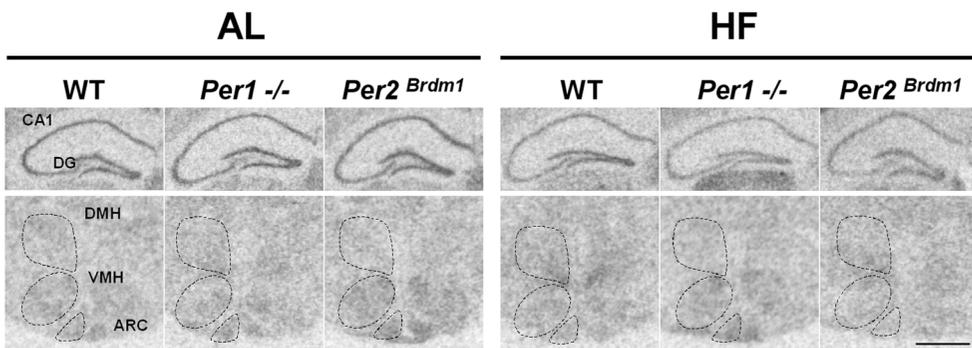


C. Structures expressing PER1 and PER2



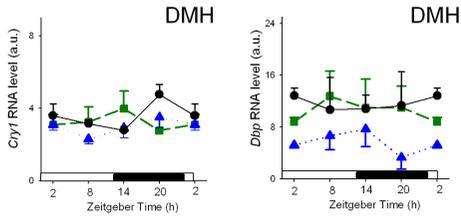


Revised Fig. 4

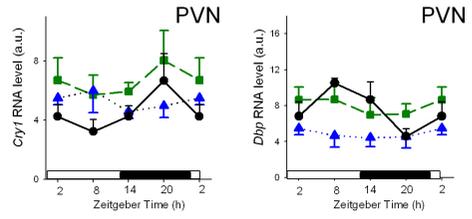


Revised Fig. 5

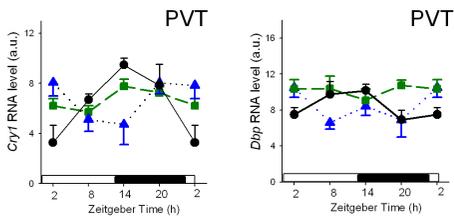
A. Structure expressing PER1



B. Structure expressing PER2



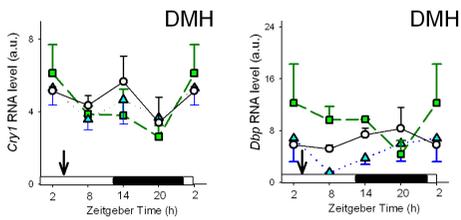
C. Structure expressing PER1 and PER2



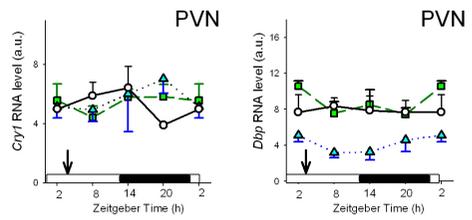
Food *ad libitum*

- WT
- *Per1*^{-/-}
- ▲ *Per2*^{Brdm1}

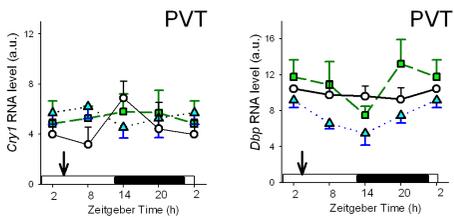
D. Structure expressing PER1



E. Structure expressing PER2

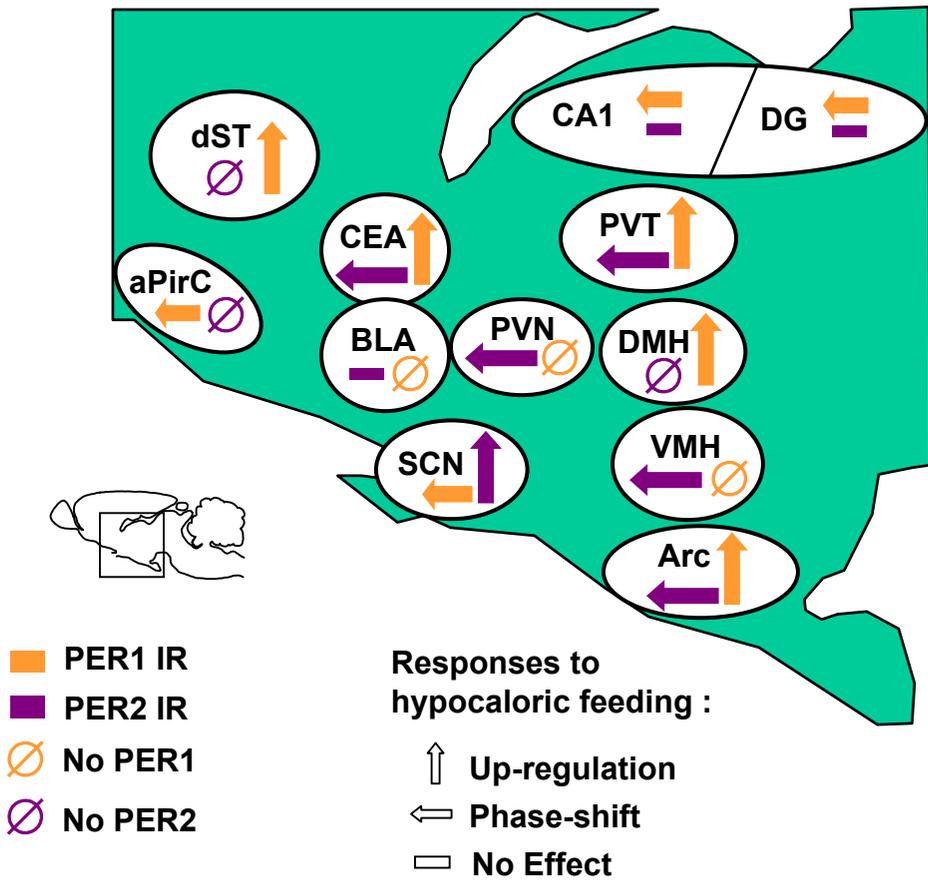


F. Structure expressing PER1 and PER2

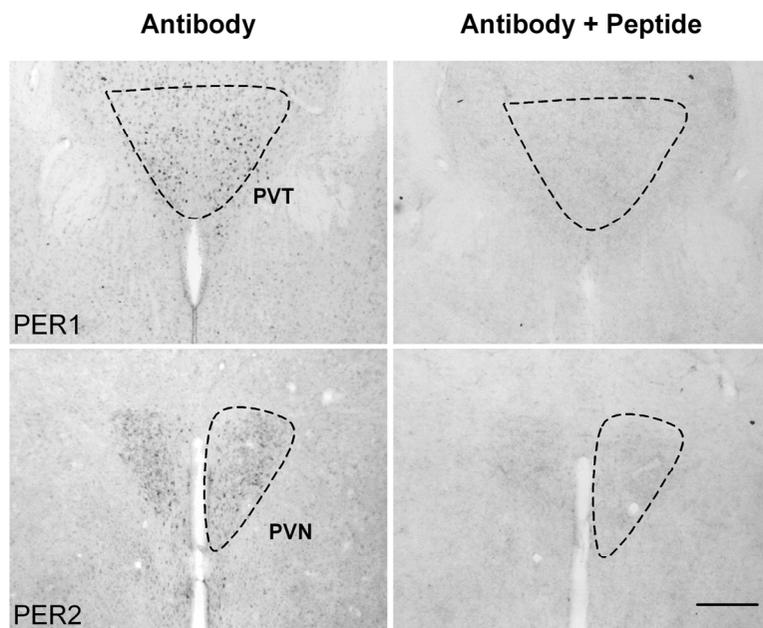


Hypocaloric feeding

- WT
- *Per1*^{-/-}
- ▲ *Per2*^{Brdm1}

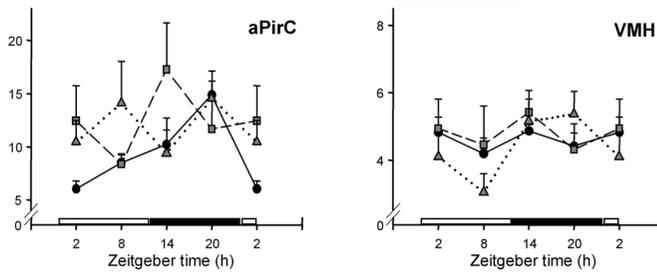


Revised Fig. 7

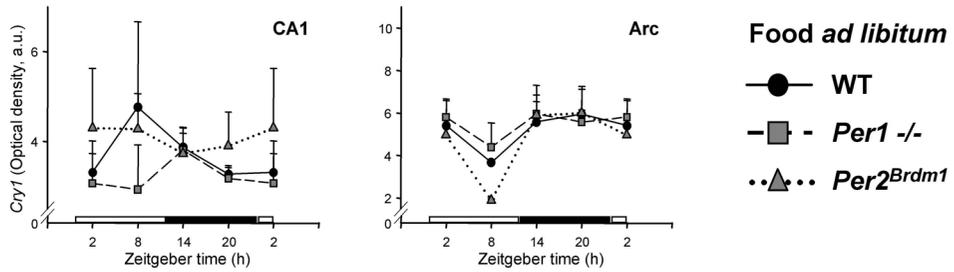


Revised Suppl. Fig. 1

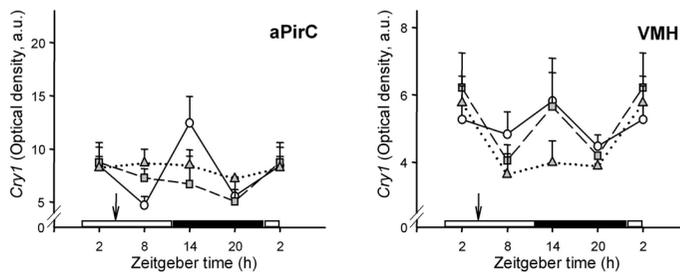
A. Structures expressing PER1 B. Structures expressing PER2



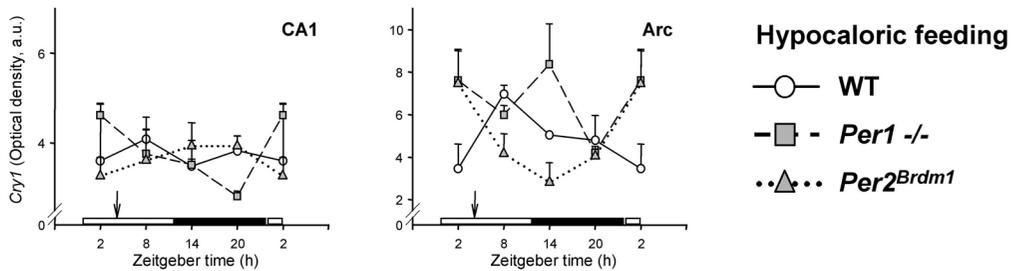
C. Structures expressing PER1 and PER2



D. Structures expressing PER1 E. Structures expressing PER2



F. Structures expressing PER1 and PER2



CHAPITRE 4
DISCUSSION GÉNÉRALE

Mon travail de thèse a permis de préciser les connaissances relatives à la synchronisation alimentaire, à la fois dans le domaine de l'intégration du message temporel alimentaire et concernant les mécanismes moléculaires sous-tendant la genèse des messages transmis vers les sorties de l'horloge alimentaire. L'étude des conséquences d'une synchronisation alimentaire sur des sorties comportementales connues des SCN, ainsi que l'importance des sorties endocrines ont également été détaillées dans ce travail. Enfin, des connaissances substantielles, ouvrant de nouvelles pistes de recherche du substrat anatomique de l'horloge alimentaire, ont été révélées. Ces différents aspects vont être abordés successivement dans cette discussion.

I. Intégration du synchroniseur alimentaire

1. Interprétation par les SCN du synchroniseur alimentaire.

L'intégration du message synchronisateur alimentaire était bien connue du point de vue comportemental (expériences de décalage horaire de l'accès à la nourriture par exemple). En revanche, les effets d'une synchronisation alimentaire sur l'horloge moléculaire des SCN ainsi que l'intégration de ces informations par d'autres oscillateurs était inconnue.

Une restriction temporelle de l'accès à la nourriture n'est capable d'agir sur l'horloge moléculaire des SCN que dans des cas isolés [souche particulière (Castillo *et al.*, 2004 ; Abe *et al.*, 1989), SCN rendus arythmiques par une exposition à la lumière continue (Lamont *et al.*, 2005)]. Par contre, une restriction calorique peut avancer la phase d'expression des gènes horloges dans les SCN (Mendoza *et al.*, 2005c). La composante métabolique plus que la composante temporelle est donc déterminante pour la synchronisation alimentaire de l'horloge principale. Néanmoins, la composante temporelle liée aux repas est essentielle pour la synchronisation de l'horloge alimentaire puisque celle-ci ne répond aux stimuli alimentaires que lorsqu'ils sont présentés dans le domaine circadien (Stephan, 1981 ; Mistlberger, 1994) ; Cependant, cela ne signifie pas que l'horloge alimentaire soit insensible à la composante calorique des repas puisqu'un repas appétitif dépourvu de valeur nutritive n'entraîne pas cette horloge (Mistlberger et Rusak, 1987). La déplétion en énergie pourrait donc influencer directement la machinerie moléculaire des SCN, et probablement l'horloge alimentaire, éventuellement *via* des récepteurs à la leptine ou à la ghréline. Nous savons que ces récepteurs existent dans les SCN (Hakansson *et al.*, 1998 ; Zigman *et al.*, 2006) ; par contre leur présence devra être démontrée sur l'horloge alimentaire. Restrictions temporelle et calorique ne sont donc pas équivalentes du point de vue de leur intégration moléculaire.

Nous avons démontré en outre que ces deux types de restriction ne sont pas non plus équivalents du point de vue de leur interprétation comportementale : des rats placés en obscurité constante peuvent être synchronisés par un nourrissage normocalorique si l'heure du repas coïncide avec la fin de la période d'activité. Un nourrissage hypocalorique synchronise quant à lui toujours l'activité locomotrice, quelle que soit la phase du repas unique. Résultat inattendu : le nourrissage normocalorique synchronise toujours l'activité locomotrice en fin

de nuit subjective, ce qui indique que celui-ci est interprété comme un signal nocturne. Au contraire, le nourrissage hypocalorique engendre un patron d'expression des gènes horloges opposé à celui observé avec la lumière ou la mélatonine : la phase d'activité locomotrice coïncide avec le pic d'expression de *Per1* au lieu de *Bmal1*, ce qui indique que le nourrissage hypocalorique est interprété par le système circadien comme un signal de jour (Caldelas *et al.*, 2005). Il faut souligner que les animaux étaient dans ce cas gardés en obscurité constante, donc sans repère temporel. Il se trouve que, dans la quasi totalité des expériences de restriction alimentaire en LD, la nourriture est distribuée de jour afin de dissocier l'activité nocturne de l'activité induite par la restriction. L'interprétation habituelle du message de synchronisation alimentaire est dans ce cas un signal de jour. Il est plus surprenant de constater que lorsque l'information lumineuse est absente, le système perçoit le nourrissage hypocalorique comme un signal de jour. Qu'est-ce qui, dans la restriction calorique, par opposition à la restriction temporelle, déclenche un tel changement de patron d'activité ? Une possibilité serait que l'intégration du message de synchronisation alimentaire soit interprétée par le système circadien en terme de niche temporelle énergétique par rapport au patron d'activité sélectionné par l'espèce : si l'animal trouve une source énergétique suffisante (nourriture *ad libitum* ou nourrissage normocalorique) dans la niche temporelle qu'il occupe habituellement (la nuit pour un rongeur nocturne), l'accès à la nourriture est interprété comme un signal de nuit. Si l'animal est soumis à une déplétion en énergie (nourrissage hypocalorique) cela pourrait indiquer au système que la ration nocturne est insuffisante et déclencherait un comportement de recherche alimentaire dans une niche temporelle différente (le jour pour un rongeur nocturne) afin d'augmenter les chances de trouver de la nourriture. Cela expliquerait pourquoi en DD les rats interprètent systématiquement la restriction calorique comme un signal diurne.

Plus encore que la seule interprétation d'un signal métabolique par le système circadien d'un rongeur nocturne, ce phénomène pourrait participer au maintien de la nocturnalité ou de la diurnalité. Nous savons que la machinerie moléculaire des SCN est identique entre rongeurs nocturnes et rongeurs diurnes (Caldelas *et al.*, 2003) et qu'elle ne peut donc pas expliquer ce phénomène. Nous venons également de voir qu'un signal métabolique hypocalorique entraîne un changement d'un patron d'activité nocturne en diurne chez le rat. Il serait donc possible que la propension à être diurne ou nocturne soit modulée par l'interprétation des signaux métaboliques par le système circadien et qu'un animal nocturne ou diurne puisse inverser sa période d'activité en réponse à des pressions de survie. Ces mécanismes pourront être testés en soumettant des rongeurs diurnes tel que l'*Arvicanthis* à une restriction calorique en conditions constantes d'éclairage et vérifier si les animaux deviennent partiellement ou totalement « nocturnes » en mesurant la phase d'expression des gènes horloges dans les SCN en relation avec la phase d'activité.

2. Intégration du message de synchronisation alimentaire hors SCN.

Nous avons souligné en introduction l'importance des gènes *Per* dans la synchronisation des SCN par la lumière, puisque les souris mutantes pour les gènes *Per1* et *Per2* présentent des réponses altérées à un créneau de lumière en obscurité constante (Albrecht *et al.*, 2001). Nos travaux ont permis d'impliquer plus largement ces gènes dans des mécanismes généraux de synchronisation au niveau central : chez des souris mutantes pour les gènes *Per1* ou *Per2*, l'expression du gène *Cry1*, autre gène horloge de la boucle négative, est altérée en conditions de nourrissage hypocalorique par rapport aux souris sauvages (Feillet *et al.*, soumis). Cela indique que l'intégration des informations métaboliques est altérée de manière générale chez ces mutants.

Ce résultat est à mettre en relation avec l'expression différentielle des protéines PER1 et PER2 dans le système nerveux central : l'expression des gènes *Per1* et *Per2* avait déjà été observée dans la quasi-totalité des structures cérébrales (Asai *et al.*, 2001; Wakamatsu *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2002; Granados-Fuentes *et al.*, 2004 ; Matsui *et al.*, 2005). Sachant qu'un grand nombre de mécanismes post-transcriptionnels et post-traductionnels interviennent dans la régulation de l'expression des gènes horloges et des protéines horloges (Ralph et Menaker, 1988 ; Reppert et Weaver, 2002 ; Lowrey et Takahashi, 2004), il était nécessaire de confirmer par immunohistochimie la présence de protéines horloges en lieu et place des gènes horloges. Nous avons démontré que, de manière inattendue, la présence d'un ARN messager pour *Per1* ou *Per2* n'entraînait pas forcément la présence de la protéine correspondante à un seuil détectable par immunohistochimie. Ainsi, nous ne trouvons pas d'expression de PER1 dans les VMH et les PVN et pas de PER2 dans les DMH alors que des ARN messagers pour ces deux protéines avaient été auparavant observés dans ces structures. Il est donc probable que dans certaines structures centrales les ARN messagers pour les gènes horloges soient transcrits, et donc détectés par hybridation *in situ*, mais pas traduits, et donc non détectables en immunohistochimie. Il y a ainsi une expression différentielle des protéines PER dans le système nerveux central. Une autre étude portant sur l'expression des gènes *Ror* (récepteurs orphelins de la boucle positive secondaire dans les SCN) démontre que *Rora*, *Rorb* et *Rory* ne sont pas exprimés systématiquement dans tous les tissus périphériques (Guillaumond *et al.*, 2005). Notre étude ciblée dans le cerveau antérieur confirme cette observation et renforce l'hypothèse grandissante que les mécanismes d'horloges, s'ils sont ubiquitaires, ne s'appuient pas toujours sur les mêmes protéines. Il y aurait donc à la fois au niveau central et au niveau périphérique, une multitude d'oscillateurs potentiels, fonctionnant avec des aiguilles différentes (Feillet *et al.*, soumis). De plus, la présence de l'une ou l'autre des protéines PER1 ou PER2 aurait des conséquences différentes du point de vue fonctionnel : nous démontrons en effet que dans une structure exprimant uniquement PER1 ou PER2, des altérations de la machinerie moléculaire (expression de *Cry1*) sont observables dans les mutants respectifs correspondants. Par exemple, dans les VMH, structure n'exprimant que PER2, les profils

d'expression de *Cry1* sont identiques aux WT, alors qu'ils sont altérés chez les souris *Per2* mutantes. Dans les structures exprimant les deux protéines, des effets différentiels sont observés chez les mutants *Per1* et *Per2*. Comment expliquer ces mécanismes différents puisqu'il a été démontré que l'horloge des SCN ne fonctionne correctement que si PER1 et PER2 sont présents tous les deux ? Nous avons vu que les gènes *Per1* et *Per2* ne sont pas équivalents en terme de synchronisation lumineuse. *Per1* est essentiel aux avances de phase alors que *Per2* serait nécessaire aux retards de phase (Albrecht *et al.*, 2001). De plus, *Per2* est indispensable au maintien de la rythmicité en obscurité constante, ce qui n'est pas le cas de *Per1* (Zheng *et al.*, 1999 ; Bae *et al.*, 2001 ; Cermakian *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2001). Il est donc avéré que PER1 et PER2 ont des fonctions différentes pour l'horloge des SCN. Et il pourrait en être de même en terme de synchronisation alimentaire : si l'on se base sur ce qui est connu pour les SCN, il est possible que des structures exprimant PER1 ou PER2 soient impliquées dans des types d'intégration différents du message alimentaire. Une structure essentielle dans les mécanismes de rythmicité alimentaire exprimera PER2. Une structure exprimant PER1 par contre ne sera pas critique pour la rythmicité en réponse à une synchronisation alimentaire à proprement parler, mais transmettra un message récurrent aux structures exprimant PER2, renforçant ainsi leur rythmicité ; elle sera donc plus particulièrement impliqué dans la synchronisation. Une structure exprimant les deux protéines serait capable d'assurer les deux fonctions. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il a été démontré que PER1 agit comme stabilisateur de PER2 dans les SCN (Masubuchi *et al.*, 2005). De plus nous avons établi que *Per2*, mais pas *Per1*, était essentiel pour le bon fonctionnement de l'horloge alimentaire et donc pour une synchronisation alimentaire normale au niveau central (Feillet *et al.*, 2006). Aucun comportement, ni aucune fonction rythmique en relation avec la synchronisation alimentaire ne peut s'exprimer chez ces mutants. Cela n'exclut pas que certaines structures puissent être synchronisées par la nourriture au niveau central, PER1 étant encore exprimé. Cette synchronisation n'aboutirait cependant pas à la transmission d'un comportement rythmique. C'est d'ailleurs ce qui est suggéré par les résultats obtenus pour l'expression de *Cry1* chez les souris mutantes pour les gènes *Per* et synchronisées par une restriction calorique : dans les structures exprimant PER1, l'expression de *Cry1* est altérée chez les mutants *Per1* et dans les structures exprimant PER2, l'expression de *Cry1* est altérée chez les mutants *Per2*. La synchronisation est donc toujours possible, quoique aberrante.

En ce qui concerne la synchronisation alimentaire, les résultats obtenus pour la réponse des protéines PER vont également dans le sens de rôles distincts pour PER1 et PER2 : en effet nous avons constaté que dans les structures hors SCN répondant à un nourrissage hypocalorique, l'expression journalière de PER2 présentait toujours une avance de phase alors que les niveaux de PER1 étaient augmentés. Le fait que la phase de PER1 ne soit pas modifiée dans ces structures en réponse à une restriction alimentaire suggère qu'il ne serait

pas impliqué dans l'adaptation au nourrissage, mais plutôt dans l'amplification du message, comme postulé dans le paragraphe précédent.

Indiquons ici que ce modèle ne serait valable que dans les structures répondant à une restriction alimentaire, ce qui, nous l'avons démontré, n'est pas le cas de toutes les structures : l'hippocampe par exemple, ne répond que très peu à une restriction calorique. Le fait que cette structure ne soit pas capable d'être synchronisée par la nourriture révèle qu'elle peut être éliminée de la liste des structures abritant potentiellement l'horloge alimentaire. Ce résultat confirme une approche lésionnelle démontrant qu'une lésion électrolytique de l'hippocampe n'abolit pas la composante d'anticipation de la nourriture (Mistlberger et Mumby, 1992). Ce résultat renforce l'hypothèse selon laquelle les phénomènes de mémoire joueraient un rôle limité dans l'horloge alimentaire (Stephan, 1984 ; Stephan, 1989 ; Mistlberger, 1994). Également, une étude récente sur l'influence d'une restriction calorique sur l'expression de PER1 et PER2 dans les SCN démontre que l'horloge principale réagit à l'inverse des autres structures étudiées dans le cerveau antérieur : l'expression de PER1 présente une avance de phase alors que PER2 est surexprimé en réponse à une restriction calorique (Mendoza *et al.*, 2007). Or cette tendance est également observée dans l'hippocampe, suggérant que deux catégories de structures cérébrales existeraient, répondant différemment vis-à-vis de la synchronisation alimentaire.

Si deux types de structures peuvent être séparés dans le système nerveux central, il ne faut pas négliger une troisième catégorie de structures, synchronisées par la nourriture et exprimant *Per1* et *Per2*, mais dans lesquelles ces gènes ne semblent pas capitaux pour la synchronisation alimentaire : les tissus périphériques (Damiola *et al.*, 2000 ; Stokkan *et al.*, 2001, Hara *et al.*, 2001 ; Yamazaki *et al.*, 2002 ; Yoo *et al.*, 2005). Nous avons en effet démontré que dans le foie et les reins, l'effet d'une synchronisation alimentaire sur l'expression des gènes horloges et des gènes contrôlés par l'horloge est identique chez des souris sauvages ou mutantes pour les gènes *Per1* ou *Per2*. En effet, si l'expression des gènes horloges est un peu différente dans le foie et les reins pour les différents génotypes disposant de nourriture à volonté, la phase d'expression de ceux-ci devient identique en réponse à une restriction alimentaire (Feillet *et al.*, 2006). La synchronisation alimentaire périphérique ne reposerait donc pas de manière critique sur les gènes *Per*, ou tout au moins sur les gènes *Per1* et *Per2*, puisque nous n'avons pas testé l'implication de *Per3*, dont le rôle reste obscur au niveau central. Il est possible qu'il ait un rôle inattendu dans la synchronisation alimentaire périphérique. Une autre possibilité est que dans les tissus périphériques, qui semblent très sensibles aux variations de la disponibilité alimentaire, les gènes *Per1* et *Per2* aient des fonctions redondantes. Chez des mutants *Per1* ou *Per2*, la fonction de l'un compensant les déficits provoqués par l'absence de l'autre, la synchronisation resterait normale et aucune différence ne serait visible sur la synchronisation après 3 semaines de restriction. Il sera possible de tester cette hypothèse en réalisant des expériences de restriction alimentaire chez des doubles mutants *Per1/Per2*.

Enfin, si l'on suppose que PER1 et PER2 conservent un rôle différentiel dans les tissus périphériques et sont impliqués dans la synchronisation alimentaire, ils pourraient commander l'un et l'autre des modes de remise à l'heure différents : dans les SCN, PER1 est impliqué dans les avances de phase de l'activité locomotrice alors que PER2 est essentiel pour les retards de phase (Albrecht *et al.*, 2001). Il n'a pas été démontré de manière définitive à ce jour, que les organes périphériques sont des horloges tissulaires (Yamazaki *et al.*, 2000 ; Yoo *et al.*, 2005 ; Ishida *et al.*, 2005 ; Oster *et al.*, 2006). PER2 et éventuellement PER1 n'auraient pas pour rôle dominant dans ces tissus de produire des oscillations auto-entretenues, mais interviendraient plutôt dans la synchronisation des oscillateurs périphériques par des messages centraux et environnementaux (Kornmann *et al.*, 2007). Dans ce cas, PER1 et PER2 seraient impliqués directement dans les remises à l'heure des tissus périphériques par avance ou retard de phase respectivement. Chez des souris mutantes pour *Per1* ou *Per2*, la synchronisation serait donc possible, mais uniquement par retards de phase chez les mutants *Per1* et par avances de phase chez les mutants *Per2*. On peut même penser que dans la phase dynamique de l'entraînement par la nourriture, les déphasages pourraient être plus rapides, en conséquence de l'absence de l'un des deux signaux de déphasage antagoniste à l'autre. Dans une phase de synchronisation dynamique, les deux phénomènes seraient radicalement différents, aboutissant cependant à un état stable identique, comme celui que nous observons pour les deux génotypes après 3 semaines de RF (Feillet *et al.*, 2006). Cette hypothèse n'est bien sûr que pure conjecture, mais pourrait être testée en effectuant un suivi de l'évolution de la phase d'expression d'un gène horloge comme *Bmal1* dans le foie, chez des souris *Per1* ou *Per2* mutantes. Un suivi dynamique sera nécessaire, par exemple grâce à un gène rapporteur type luciférase et confirmera ou infirmera l'hypothèse présente.

En l'état actuel des connaissances, il est donc difficile d'établir de manière absolument certaine si la synchronisation alimentaire périphérique est totalement indépendante des gènes *Per*.

II. Mécanismes moléculaires de la synchronisation alimentaire

1. Les souris mutantes : outil privilégié pour l'étude de la synchronisation alimentaire.

Parmi les approches destinées à comprendre le fonctionnement de l'horloge alimentaire, les souris mutantes ont fourni plusieurs résultats intéressants : Les souris KO pour les orexines présentent une atténuation de la FAA (Akiyama *et al.*, 2004 ; Mieda *et al.*, 2004), ainsi que les souris mutantes pour les récepteurs μ -opioïdes (Kas *et al.*, 2004) ou les récepteurs orphelins *Ear2* (Warnecke *et al.*, 2005), impliquant ainsi plusieurs systèmes de neurotransmetteurs et de neuropeptides dans la connectivité de l'horloge alimentaire.

Mais l'approche mutante a surtout été un outil de choix dans l'acquisition de connaissances concernant la machinerie moléculaire sous-tendant le fonctionnement de l'horloge alimentaire. Le principe utilisé est le même que celui qui a permis d'identifier les premiers gènes horloges dans les SCN : on suppose qu'un gène intervient dans la rythmicité circadienne et une lignée de souris mutantes pour ce gène est générée. Les souris sont ensuite placées dans diverses conditions lumineuses, soumises à des créneaux de lumière, puis les rythmes d'expression des autres gènes horloges sont mesurés dans les SCN. Si des altérations par rapport aux souris sauvages sont observées, des hypothèses sont formulées quant à la place occupée par le gène muté dans les boucles moléculaires (voir introduction section II-4 pour les caractéristiques des différents mutants pour les gènes horloges). Pourquoi utiliser ces mêmes mutants dans la recherche des mécanismes de la synchronisation alimentaire ? Peut-être parce qu'il est rassurant de pouvoir s'appuyer sur des mécanismes existants, connus dans d'autres horloges et oscillateurs. En effet, l'expression des gènes horloges semble ubiquitaire et même des cellules isolées en culture expriment ces gènes de manière rythmique. Pourquoi n'en serait-il pas de même pour toutes les horloges ? Pourtant, une certaine prudence semble requise puisque nous avons démontré que l'expression d'un gène horloge dans un tissu n'entraînait pas systématiquement la présence de sa protéine (Feillet *et al.*, soumis). Cependant, en absence d'un meilleur modèle, nous devons discuter en fonction de ce dont nous disposons : des boucles moléculaires de rétroaction. Et finalement, il semblerait que cette stratégie soit prometteuse, puisqu'un certain nombre de mutations des gènes horloges altèrent la réponse comportementale à une synchronisation alimentaire.

1.1. Les mutants *Npas2* et *Clock*.

Pourtant ce pari n'était pas gagné d'avance puisque la première étude du genre, réalisée par Pitts et collaborateurs en 2003 a révélé que le gène *Clock*, identifié comme l'un des acteurs majeurs des boucles moléculaires des SCN (King *et al.*, 1994 ; DeBruyne *et al.*, 2007), n'entrerait pas dans les boucles moléculaires de l'horloge alimentaire. Les résultats, obtenus sur la base de la quantification de la FAA en LD et en DD, en réponse à une restriction temporelle de l'accès à la nourriture, semblent clairs. Il n'en est malheureusement pas de même pour les études qui ont suivi : en 2001, Reick et collaborateurs identifient le remplaçant potentiel de *Clock* pour l'horloge alimentaire. Il s'agirait de son analogue, présent dans le télencéphale : NPAS2 (Reick *et al.*, 2001). Les souris mutantes pour ce gène sont testées pour la composante d'anticipation en réponse à une restriction temporelle. Les auteurs concluent à un retard dans l'apparition de la FAA, ce qui impliquerait NPAS2 dans les mécanismes moléculaires de l'horloge alimentaire (Dudley *et al.*, 2003). Cependant, le protocole utilisé ne semble pas toujours approprié : tout d'abord, le temps d'accès à la nourriture, 4 heures dans cette expérience, ne correspond pas à une restriction temporelle, supposée permettre le maintien de la masse corporelle, puisque les souris perdent jusqu'à 30 % de leur poids de

départ dans les 7 jours suivant le début de la restriction, mais serait plutôt une restriction calorique sévère. Il s'ensuit une mortalité importante, interdisant à mon sens toute conclusion définitive sur la fonction de NPAS2. Les auteurs pallient à la déplétion en énergie en distribuant une ration supplémentaire quotidienne aux souris jugées « malades ». Un protocole de restriction plus modéré aurait probablement permis d'éviter la perte importante des souris restreintes. De plus, le seul paramètre utilisé pour estimer les conséquences de la mutation est l'activité locomotrice, alors qu'une lésion peut par exemple altérer l'une ou l'autre des sorties de l'horloge alimentaire indépendamment des autres (Davidson et Stephan, 1999 ; Recabarren *et al.*, 2005).

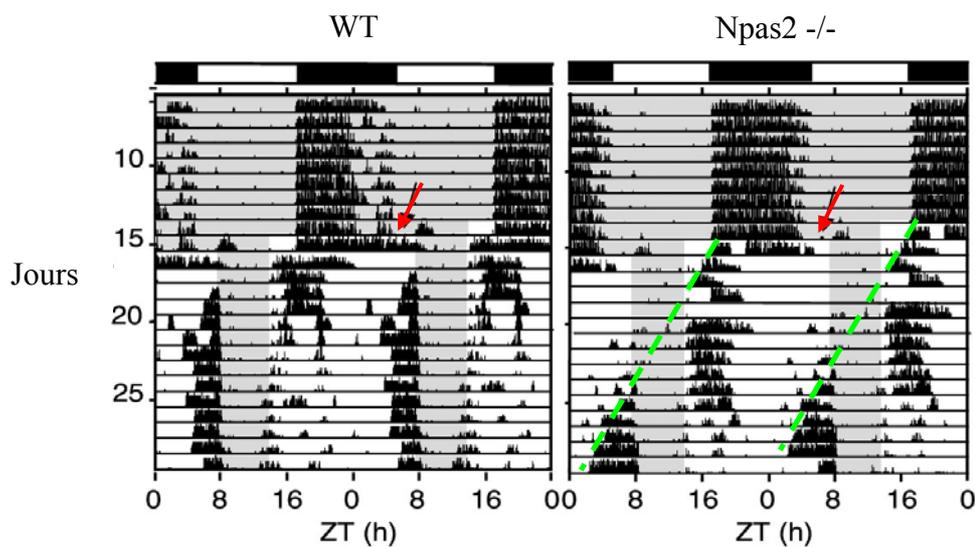


Figure 37 : Actogrammes en double représentation d'une souris sauvage (WT) et d'une souris mutante pour le gène *Npas2* (*Npas2* *-/-*) en LD, puis en DD (début indiqué par la flèche rouge) soumises à une restriction alimentaire.

Le régime lumineux est indiqué au dessus de chaque actogramme. La zone grisée sur chaque actogramme correspond à la période durant laquelle la nourriture est disponible. Les jours sont reportés à gauche de chaque actogramme. La ligne verte pointillée indique la projection possible du début de l'activité chez les mutants NPAS2, probablement contrôlée par les SCN.

(Adapté de Dudley *et al.*, 2003)

Enfin, à l'observation approfondie de l'actogramme, il semblerait que l'activité locomotrice présente un phénomène de libre cours, l'activité suivant la fin de l'accès à la nourriture en début d'expérience, puis disparaissant derrière cet accès probablement masquée par la prise alimentaire, et enfin réapparaissant en une composante d'anticipation. Si cette hypothèse est exacte, ces mutants pourraient bien présenter un phénotype plus marqué que celui qui a été dégagé par les auteurs. La FAA observée avec un retard pourrait n'être que la traversée de l'activité locomotrice contrôlée par les SCN, à travers la période d'accès à la nourriture. Un protocole d'accès à la nourriture calibré, sur une durée plus longue, ainsi que la mesure de paramètres supplémentaires sera nécessaire pour tirer une conclusion sur ces mutants, qui ne sont peut-être plus capables d'anticiper l'heure d'accès à la nourriture.

1.2. Les mutants *Cry*

Dans la troisième étude, portant sur les mutants *Cry1/Cry2*, une fois encore, la question de la méthodologie est posée. Les auteurs adressent cependant un grand nombre de questions, même si la lisibilité limitée des actogrammes remet parfois en question leur interprétation. La FAA est ainsi estimée dans trois conditions : en LD, en LD suite à des lésions des SCN et en DD (Iijima *et al.*, 2005). Les auteurs s'affranchissent ainsi de l'éventuelle influence délétère de la lumière sur l'activité locomotrice (en DD) et évitent tout repère temporel supplémentaire qui permettrait un phénomène de mémoire sablier, en établissant une concordance entre l'heure du nyctémère et l'heure d'accès à la nourriture (lésion des SCN). Ces contrôles sont importants et ajoutent un poids méthodologique à cette étude. Un autre point important soulevé par les auteurs est le problème de la persistance du comportement anticipatoire observé. Il a été démontré que la FAA peut persister et même réapparaître après une période *ad libitum*, à l'heure attendue de l'accès à la nourriture, lorsque l'animal est soumis à une période de jeûne (Stephan *et al.*, 1979 ; Boulos *et al.*, 1980 ; Coleman *et al.*, 1982 ; Clarke et Coleman, 1986 ; Ruis *et al.*, 1989). Cette caractéristique démontre l'endogénicité du rythme. Iijima et collaborateurs ont testé ce phénomène dans chacune de leurs expériences. La persistance durant 2 jours de jeûne et 2 jours de nourrissage *ad libitum* chez les WT confirme les résultats obtenus précédemment. La disparition de la FAA chez les doubles mutants *Cry1/Cry2* après 2 jours en DD et après 1 jour après lésion des SCN démontre la probable disparition de l'endogénicité de la FAA et le fonctionnement défectueux de l'horloge alimentaire. Il est regrettable, avec un résultat si fort, que les auteurs ne discutent pas de l'implication des SCN et de l'information lumineuse sur le comportement d'anticipation chez ces mutants en LD, condition où la FAA persiste lors du jeûne. Une interprétation possible serait que les SCN, toujours synchronisés par l'alternance du jour et de la nuit, fournissent un repère temporel à l'ensemble du cerveau. Pour pallier au fonctionnement défectueux de l'horloge alimentaire chez les mutants, des systèmes de mesure du temps de type sablier pourraient se mettre en place : la nourriture arrivant 4 heures après l'allumage des lumières, ce système mesurerait approximativement le délai entre l'allumage des lumières et l'arrivée de la nourriture, déclenchant ainsi un pseudo-comportement de recherche alimentaire, interprété comme FAA sur les actogrammes en LD. Cela pourrait expliquer la relative instabilité de la FAA, un système de type sablier pouvant être moins précis qu'une horloge véritable. En LD, le repère temporel persistant, la FAA persisterait également lors d'un jeûne. En DD, en absence de repère vis-à-vis du cycle LD et les SCN étant arythmiques, la persistance serait limitée à un ou deux cycles, s'appuyant peut-être sur des phénomènes de mémoire temporelle. Enfin, suite à une lésion des SCN en LD, aucune perception de l'heure externe n'étant disponible, l'absence de repère temporel exclut toute remise à l'heure ou déclenchement d'un sablier. Le comportement anticipatoire disparaît en un cycle. Il

semblerait donc que l'implication des gènes *Cry* puisse être plus importante que celle conclue par les auteurs.

Si les auteurs ont analysé en détail les caractéristiques de l'horloge alimentaire, aucune information sur la perte de poids des souris n'est disponible ici et il est difficile d'estimer si les souris ont été soumises à une réelle restriction temporelle (4 heures d'accès à la nourriture). Cependant, les résultats de perte de masse obtenus avec le même accès dans l'étude précédente, ainsi que les valeurs de prise alimentaire (inférieures de 30 à 60 % à la prise alimentaire de la condition *ad libitum*) laissent supposer que la restriction serait bien une restriction calorique. De plus, connaissant la sensibilité importante des souris au jeûne, un jour de jeûne précédent la restriction, plus deux jours de jeûne suivant la restriction, ont probablement constitué une déplétion importante en énergie. Ce type de protocole peut provoquer une irrégularité dans l'activité locomotrice et rendre difficile la lecture et l'interprétation de actogrammes. De plus, la période limitée de la restriction, seulement 7 jours, est un peu courte pour l'établissement d'un comportement stable. Une restriction plus longue, mais aussi plus modérée, suivie d'une période *ad libitum* et d'un jeûne auraient peut-être permis de tirer des conclusions plus sûres et plus fortes quant à l'implication des gènes *Cry* dans le fonctionnement de l'horloge alimentaire. Tout comme dans l'article sur les mutants NPAS2, on peut également regretter qu'un seul paramètre comportemental ait été utilisé pour la mesure de la FAA.

Si l'implication des gènes *Cry* dans la machinerie moléculaire sous tendant le fonctionnement de l'horloge alimentaire est plus que probable, un protocole un peu différent et des mesures additionnelles, ainsi que l'investigation de l'implication individuelle de *Cry1* et *Cry2* (chez des mutants simples par exemple) sont souhaitables afin d'affiner les résultats disponibles à ce jour.

1.3. Nécessité de standardiser l'étude des mutants.

Les différentes études réalisées chez des souris mutantes ont soulevé un certain nombre de problèmes méthodologiques vis-à-vis de la synchronisation alimentaire. Si les protocoles d'étude de la rythmicité et de l'influence d'une mutation sur l'horloge des SCN sont désormais calibrés et comprennent un batterie de tests standardisés (LD, conditions constantes, créneaux de lumière, décalages de phase), il n'en est pas de même pour l'horloge alimentaire, ce qui rend parfois difficile l'interprétation des résultats obtenus. La connaissance des limites soulevées par les expériences analysées ci-dessus nous enseigne les précautions à prendre lorsque l'on veut tester la synchronisation alimentaire chez des souris mutantes pour les gènes horloges, ou chez d'autres espèces d'ailleurs :

- En premier lieu, il convient de mettre en place un protocole de restriction stricte selon les paramètres à tester :

Une restriction temporelle de l'accès à la nourriture se distingue d'une restriction calorique en cela que la prise alimentaire doit être suffisante pour que la masse corporelle de l'animal ne diminue pas et puisse même augmenter au cours de l'expérience. Dans ce cas, l'animal a accès à la nourriture plusieurs heures par jour, l'accès commençant toujours à la même heure. Il ne peut manger que durant ces heures.

Un accès normocalorique se distingue de la restriction temporelle en cela que la nourriture est pesée quotidiennement et une ration équivalente à la prise alimentaire mesurée en conditions *ad libitum* est distribuée chaque jour à la même heure. Dans ce cas, l'animal peut consommer sa ration à la fois durant le jour et la nuit (Mendoza *et al.*, 2005c) et il est plus difficile de déterminer les heures durant lesquelles survient la prise alimentaire.

Une restriction calorique comprend, en plus de la composante temporelle de synchronisation alimentaire, une composante métabolique puisque par définition une ration hypocalorique est fournie à l'animal. Ce protocole suppose une mesure préalable de la prise alimentaire en condition *ad libitum* puis la distribution quotidienne d'une ration hypocalorique individuelle.

- Afin de calibrer les étapes d'un protocole de restriction il faut connaître parfaitement la tolérance de l'espèce considérée vis-à-vis d'une restriction alimentaire.

L'accès à la nourriture lors d'une restriction temporelle peut par exemple difficilement être inférieur à 6-8 heures chez la souris puisque cette espèce, disposant de peu de réserves énergétiques, va rapidement perdre du poids si l'accès est diminué à 4 heures. Par contre, chez le rat, selon la souche, un accès quotidien de 2 à 6 heures est en général bien toléré.

La restriction calorique correspond en général à 66% de la prise alimentaire de base chez la souris. Cette restriction permet d'obtenir une perte de poids stabilisée autour de 20 %. Au delà de 20% de perte de poids, la déplétion en énergie est trop grande et peut entraîner des changements comportementaux comme l'hyperactivité ou la prostration, pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal. Chez le rat, une perte de masse stable autour de 20% peut être obtenue en distribuant une ration hypocalorique de 50% inférieure à la ration normocalorique.

Dans tous les cas, le protocole doit être testé au préalable sur un groupe contrôle ou faire référence à un protocole identique déjà utilisé et dont les caractéristiques sont satisfaisantes pour un protocole de restriction temporelle ou calorique.

- Un suivi hebdomadaire, voir bihebdomadaire, de la masse corporelle et de la prise alimentaire est essentiel à la validation d'une condition de restriction temporelle ou calorique.
- Il est préférable que l'heure d'accès à la nourriture ne se trouve pas durant la nuit afin de dissocier la FAA de la composante nocturne d'activité.
- La restriction devrait systématiquement être appliquée durant au moins 15 jours afin d'obtenir un comportement stable. Cette durée peut être allongée si l'on veut mesurer le passage de la composante d'activité contrôlée par les SCN à travers la FAA contrôlée par l'horloge alimentaire, en conditions d'obscurité ou de lumière constantes.
- Toute expérience estimant l'effet d'une mutation ou d'un traitement sur la synchronisation alimentaire devrait être réalisé dans deux conditions lumineuses différentes, par exemple LD et DD, afin d'estimer l'influence de l'alternance du jour et de la nuit sur la persistance de la FAA (LD) et de s'affranchir de cette composante (DD ou LL).
- Il est préférable de tester la FAA sur deux paramètres comportementaux ou physiologiques afin d'éviter tout effet spécifique d'une mutation sur l'une des sorties de l'horloge alimentaire.
- Sachant que le fonctionnement de l'horloge alimentaire est endogène, un test de jeûne semble requis pour démontrer que la FAA observée, s'il est possible d'en observer une, est bien une sortie d'une horloge auto-entretenu. Ce test sera fait de préférence plusieurs jours après l'arrêt de la restriction, après une période de nourrissage *ad libitum* par exemple, afin d'éviter tout phénomène de sablier. Suite à une restriction calorique, la période *ad libitum* avant le jeûne permet d'éviter une déplétion en énergie supplémentaire.
- Une lésion des SCN pourra être réalisée en addition, afin d'éviter tout repère temporel en association avec l'horloge principale, via le couplage SCN/horloge alimentaire par exemple.

Il est souhaitable qu'un protocole standardisé de ce type soit utilisé pour chacune des expériences investigant la persistance du fonctionnement de l'horloge alimentaire à la fois chez des mutants et dans le cadre de lésions. Cela devrait permettre une meilleure lisibilité de résultats et la comparaison des différences obtenues pour chaque génotype ou condition expérimentale.

1.4. Mutants *Per*.

Conscients des contraintes liées à l'investigation de l'implication d'une mutation sur un gène horloge pour le fonctionnement de l'horloge alimentaire, nous avons mis en place un protocole répondant aux critères mentionnés ci-dessus.

Nous avons ainsi démontré que dans 3 conditions lumineuses différentes (LD, DD, LL), dans deux conditions de restriction (temporelle et calorique) et pour trois paramètres comportementaux et physiologiques (activité de roue, activité générale et température) la composante d'anticipation des repas est absente chez les souris mutantes pour le gène *Per2* et ce, dans un état de synchronisation stable. Par contre, le phénotype observé chez les mutants *Per1* est comparable, en termes d'anticipation, à celui observé chez les souris sauvages de la même souche.

Le résultat tranché obtenu chez les mutants *Per2* est à mettre en balance avec les phénotypes plus modérés observés jusqu'ici. Il nous permet d'impliquer *Per2* comme l'un des composants majeurs de la machinerie moléculaire de l'horloge alimentaire, nécessaire pour le fonctionnement de cette horloge et pour le contrôle d'au moins deux de ses sorties (Feillet *et al.*, 2006). Ce résultat confirme également que les mutants pour les gènes horloges sont de bons outils pour étudier le fonctionnement de l'horloge alimentaire.

Cependant, nos résultats ne permettent pas d'éliminer *Per1* de cette machinerie de manière définitive : dans les SCN, *Per2*, mais pas *Per1*, est essentiel au maintien de la rythmicité circadienne. Par contre, tous deux participent aux réponses normales à la lumière. Il est donc possible que *Per1* est une fonction dans la synchronisation dans l'horloge alimentaire et non un rôle de maintien des oscillations (voir perspectives). En outre, nous avons démontré que des structures n'exprimant que PER1 pouvaient être synchronisées par la nourriture, soulevant une fois de plus la question du rôle de *Per1* dans l'horloge alimentaire.

Nos résultats, associés à ceux obtenus auparavant, nous conduisent à proposer un modèle moléculaire sous-tendant le fonctionnement circadien de l'horloge alimentaire :

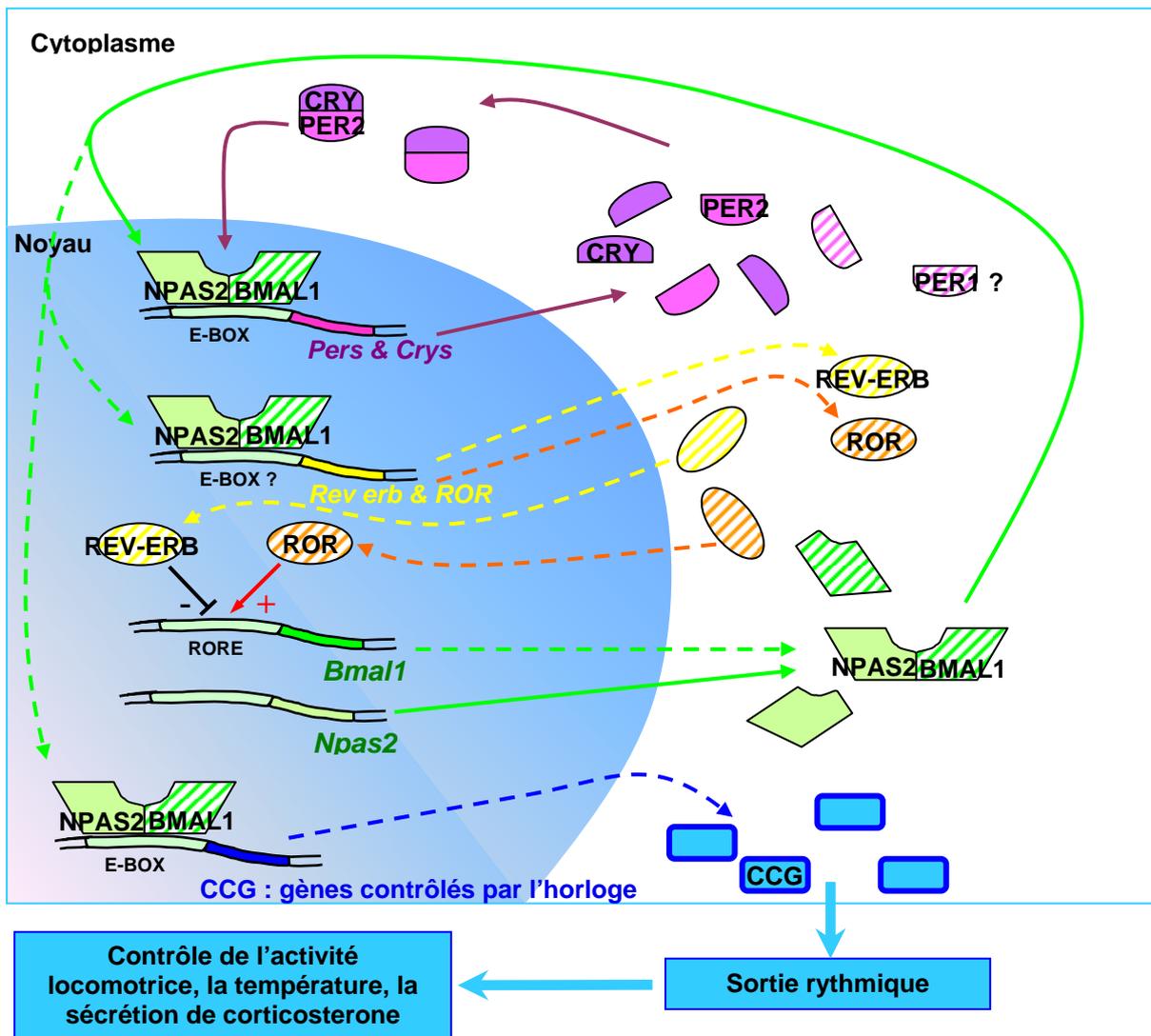


Figure 38 : Modèle potentiel des mécanismes moléculaires sous tendant la rythmicité de l'horloge alimentaire.

Jusqu'ici, les gènes *Npas2*, *Cry1*, *Cry2* et *Per2* ont été impliqués dans ces mécanismes. Ainsi, leurs produits protéiques et les flèches qui y sont connectées sont en traits pleins. Le rôle possible de *Per1*, *Rev-erb*, *ror* et *Bmal1*, ainsi que la présence de gènes contrôlés par l'horloge restent à confirmer. Leur présence a été extrapolée à partir des mécanismes connus dans les SCN. Leurs produits protéiques ainsi que les flèches connexes sont en couleurs hachurées et en traits pointillés respectivement, afin d'indiquer le caractère purement conjecturel de cette partie du modèle.

III. De l'importance des sorties de l'horloge alimentaire

1. La mélatonine.

Comme nous l'avons vu en introduction, un certain nombre de sorties connues de l'horloge principale (activité locomotrice, corticostérone, température) peuvent être influencées par une restriction alimentaire (Holloway *et al.*, 1979 ; Chik *et al.*, 1987 ; Challet *et al.*, 1997c ; Mendoza *et al.*, 2005c). Chez des animaux intacts, leurs patrons d'expression sont la résultante de l'influence des SCN et de l'horloge alimentaire (Mistlberger, 1994). Après lésion des SCN, le contrôle unique par l'horloge alimentaire synchronise toutes ces sorties. Un pic anticipatoire s'exprime donc dans l'activité locomotrice, la corticostérone et la

température (Krieger, 1974 ; Nelson *et al.*, 1975 ; Stephan *et al.*, 1979 ; Mistlberger, 1994 ; Challet *et al.*, 1997c ; Recabarren *et al.*, 2005). Si ces phénomènes étaient bien connus, il est plus exceptionnel de constater que l'horloge alimentaire peut influencer sur une sortie jusque là considérée comme exclusive des SCN : la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale. Après lésion des SCN, les rythmes d'*aa-nat*, enzyme limitante dans la synthèse de mélatonine, et de mélatonine sont arythmiques dans la glande pinéale (Perreau-Lenz *et al.*, 2003). De manière inattendue, la mélatonine, redevient rythmique dans cette même structure lors d'une restriction temporelle de l'accès à la nourriture chez le rat. Nous avons donc ici une nouvelle sortie inattendue de l'horloge alimentaire (Feillet *et al.*, en préparation).

Mais la glande pinéale est-elle une sortie directe ? Si nous supposons que c'est le cas, il nous faut envisager que l'horloge alimentaire compte parmi ses voies de sortie, l'un des composants de la voie poly-synaptique bien connue des SCN à la glande pinéale et contrôlant la sécrétion de mélatonine : noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), colonne intermédiolatérale de la moelle épinière, ganglions cervicaux supérieurs (Larsen, 1999 ; Teclerian-Mesbah *et al.*, 1999 ; Simonneaux et Ribelayga, 2003). Cette hypothèse pourra être testée en réalisant soit une lésion des PVN, soit une dénervation sympathique. L'une ou l'autre de ces chirurgies, voire les deux, si elles suppriment le rythme de mélatonine restauré par la RF, indiqueront que le contrôle de la sécrétion de mélatonine par l'horloge alimentaire est similaire à celui opéré par les SCN.

Cependant, au vu des résultats obtenus dans notre expérience, il est également possible que la restauration de la rythmicité observée soit une conséquence indirecte des réponses physiologiques et comportementales à la restriction. La mélatonine serait alors une sortie, mais indirecte, de l'horloge alimentaire : les rats restreints présentent à la fois une FAA et un pic anticipatoire de corticostérone ; chez ces animaux, le rythme de mélatonine est restauré. Chez les animaux restreints et immobilisés, le pic de corticostérone persiste, mais l'activité locomotrice est inhibée. Le rythme de mélatonine n'est pas restauré. Une interprétation possible est que la FAA stimule le système nerveux sympathique, provoquant une libération de noradrénaline dans la glande pinéale, ce qui aboutirait à la synthèse de mélatonine (Simonneaux et Ribelayga, 2003). Chez les rats nourris *ad libitum* et soumis à une immobilisation pendant l'anticipation des rats restreints, un pic de corticostérone est exprimé, dû au stress d'immobilisation : chez ces animaux, aucun rythme de mélatonine n'est observable, éliminant la corticostérone comme message suffisant pour contrôler la restauration du rythme de mélatonine dans la glande pinéale (Feillet *et al.*, en préparation). Cependant, nous ne pouvons pas exclure, sur la base de nos résultats, que le pic anticipatoire de corticostérone participe à cette restauration. Des informations redondantes provenant de sorties de différentes sorties l'horloge alimentaire (activité locomotrice et corticostérone) déclenchent la synthèse de la mélatonine : la corticostérone pourrait agir sur des récepteurs aux glucocorticoïdes présents dans la glande pinéale, qui à leur tour iraient activer la

transcription de l'*aa-nat* via une boîte GRE (glucocorticoid responsive element) présente dans son promoteur (Estrada-Rodgers et al., 1998 ; De Kloët *et al.*, 1998 ; Ferreira et al., 2005 ; Fernandez et al., 2006). Un signal supplémentaire, provenant de l'activité locomotrice, *via* le système nerveux sympathique par exemple, compléterait le signal de biosynthèse de la mélatonine. Une expérience utilisant des rats SCN lésés et surrénalectomisés, soumis à une restriction alimentaire et éventuellement immobilisés, nous permettrait d'éliminer la corticostérone comme possible acteur de la restauration du rythme de mélatonine dans la glande pinéale.

En se basant sur nos résultats, nous proposons le modèle ci-après, qui résume notre hypothèse actuelle :

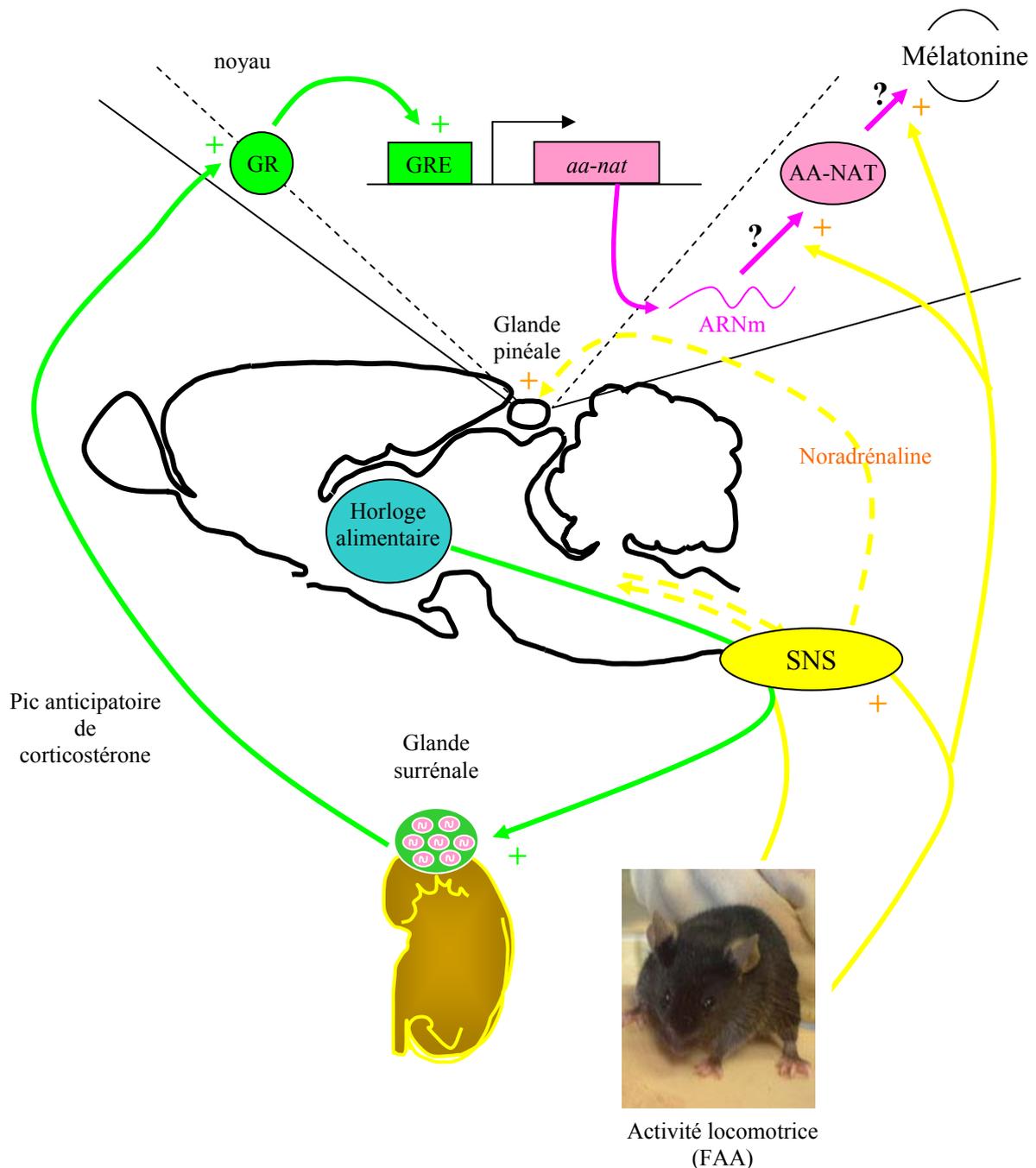


Figure 39: Mécanismes de stimulation de la synthèse de mélatonine par l'horloge alimentaire.

Lors d'une restriction alimentaire chez un animal SCN lésé, l'horloge alimentaire (cercle bleu) contrôle le pic anticipatoire de corticostérone et la FAA. La corticostérone agit par voie humorale sur la glande pinéale en se fixant sur ses récepteurs (GR) sur la membrane nucléaire des pinéaloctes. Les récepteurs GR agissent à leur tour dans le noyau sur des boîtes GRE, présentes dans le promoteur de l'*aa-nat*, pour stimuler sa transcription. L'activité locomotrice active la traduction de l'*aa-nat* (flèches jaunes pleines ou pointillées), ce qui aboutit à la synthèse de mélatonine, potentiellement *via* un message noradrénergique libéré par le système nerveux sympathique (SNS, flèches jaunes pointillées) dans la glande pinéale.

Il est donc possible que la mélatonine soit une sortie indirecte de l'horloge alimentaire, permettant ainsi la synchronisation supplémentaire par l'intermédiaire de cette hormone. Des tissus qui ne seraient pas des cibles directes de l'horloge alimentaire et possédant des récepteurs à la mélatonine, pourraient ainsi être synchronisés par celle-ci grâce au message mélatoninergique généré de manière secondaire.

2. La corticostérone.

Considérant les résultats obtenus avec la mélatonine, il n'est pas impossible que certaines des sorties mesurées habituellement lors de la synchronisation alimentaire soient des sorties indirectes de l'horloge alimentaire, exprimées en réponse au pic anticipatoire d'une autre sortie. Il était donc possible que la FAA soit provoquée par le pic anticipatoire de corticostérone. Or, nos résultats permettent de réfuter cette hypothèse puisqu'une inhibition du pic de corticostérone par voie pharmacologique (injection de métyrapone, inhibiteur de synthèse de corticostérone) ou chirurgicale (ablation de la glande surrénale) n'abolit pas la FAA (Feillet *et al.*, en préparation).

Par contre, il ne nous est pas possible de conclure le fait inverse : nous avons effectivement inhibé la FAA par immobilisation quotidienne des animaux, mais ce traitement semble constituer un stress important et les animaux présentent donc un pic de corticostérone au même moment que l'anticipation. Il est difficile de savoir si ce pic est exclusivement une réponse de stress ou s'il résulte à la fois du stress d'immobilisation et de la composante d'anticipation. La question reste donc entière et d'autres expériences seront nécessaires pour y répondre.

Cependant, une expérience permettant l'inhibition de l'activité locomotrice sans manipulation ou immobilisation de l'animal sera difficile à mettre en place : une possibilité serait d'injecter un hypnotique afin que l'animal dorme durant la composante d'anticipation. Nous pouvons nous attendre dans ce cas à des effets secondaires dus à l'hypnotique et non spécifiques de la simple inhibition de l'activité locomotrice. Des peptides comme le TGF, la PK2 ou le CLC ont été identifiés comme de potentiels facteurs sécrétés par les SCN inhibant l'activité locomotrice durant le jour (Kramer *et al.*, 2001 ; Cheng *et al.*, 2002 ; Kraves et Weitz, 2006). Une infusion intra-cérébro-ventriculaire de l'un de ces peptides pourrait être utilisée pour inhiber de manière plus spécifique l'activité locomotrice de manière réversible durant la FAA et mesurer ainsi la sécrétion de corticostérone durant cette période.

IV. Substrat anatomique de l'horloge alimentaire

Si ce travail de thèse a apporté des informations substantielles sur les mécanismes moléculaires sous-tendant le fonctionnement de l'horloge alimentaire, sa localisation reste encore à déterminer. Quelques pistes ont été explorées, certaines conduisant à l'élimination de structures, d'autres ouvrant de nouvelles perspectives de recherche.

1. La glande surrénale.

De nombreuses études suggèrent que l'horloge alimentaire se trouverait dans le système nerveux central, ou du moins qu'elle ne se trouverait pas dans le système digestif (Davidson *et al.*, 2003). La glande surrénale, responsable de la production de corticostérone, était elle aussi un candidat possible, sinon pour abriter l'horloge alimentaire en elle-même, au moins pour constituer un système d'entrée nécessaire à l'entraînement de celle-ci. Il est en effet improbable que la glande surrénale abrite une horloge (Ishida *et al.*, 2005 ; Oster *et al.*, 2006). Par contre, qu'elle soit entraînable par la nourriture et fournisse un signal capital pour la synchronisation de l'horloge alimentaire (pic anticipatoire de corticostérone) n'était pas une hypothèse aberrante. Notre étude sur des rats surrénalectomisés indique pourtant que la FAA est tout à fait normale dans ce cas, réfutant cette hypothèse et éliminant à la fois la corticostérone et tout autre message provenant de la glande surrénale comme nécessaires à la synchronisation de l'horloge alimentaire (Feillet *et al.*, en préparation). La glande surrénale et la corticostérone sont donc bien des sorties de l'horloge alimentaire.

2. Une approche innovante pour découvrir la localisation de l'horloge alimentaire.

S'il n'est pas possible, en l'état actuel des connaissances, d'éliminer totalement les tissus périphériques comme substrat anatomique de l'horloge alimentaire, la probabilité pour qu'elle se trouve dans une structure centrale est élevée.

Cependant, la lésion de la quasi-totalité des structures impliquées dans la prise alimentaire, l'éveil et la balance énergétique s'étant révélée infructueuse (Mistlberger et Rechtschaffen 1984 ; Mistlberger et Rusak, 1988 ; Challet *et al.*, 1997b ; Mistlberger et Antle, 1999 ; Davidson *et al.*, 2000 ; Davidson *et al.*, 2001a ; Gooley *et al.*, 2006 ; Landry *et al.*, 2006 ; Landry *et al.*, 2007), il était nécessaire de mettre en place une nouvelle méthode d'investigation. Notre hypothèse était que des structures impliquées dans la synchronisation alimentaire au niveau central verraient leur activité s'adapter en cas de restriction alimentaire, et donc leur consommation locale de glucose se modifier. Nous avons donc mesuré la consommation locale de glucose dans un grand nombre de structures cérébrales lors d'une restriction temporelle ou d'une restriction calorique, comparée à une condition *ad libitum*, grâce à la technique du 2-DésoxyGlucose (2-DG). Les deux types de restriction devaient nous permettre de distinguer les structures impliquées dans les composantes temporelle ou énergétique de la synchronisation alimentaire. Le 2-DG est une molécule analogue au glucose, qui peut être captée par les cellules grâce aux mêmes transporteurs que celui-ci et peut subir la première étape de la glycolyse. Sa structure ne lui permet cependant pas d'être métabolisé plus avant et il s'accumule donc dans les cellules métaboliquement actives. Marqué au ^{14}C , il permet d'estimer la consommation locale de glucose. Cette technique présentait pour nous de nombreux avantages : nous pouvions quantifier sans *a priori* les

variations de consommation de glucose dans le cerveau, afin d'obtenir des données sur l'activité cérébrale fonctionnelle entre les différentes conditions (Sokoloff, 1981). Nous avons donc une approche inverse de celles qui avaient été utilisées jusque là : nous n'avons pas une seule structure pour cible, mais des dizaines. Cela nous permettait également de mettre à l'épreuve une théorie avancée depuis plusieurs années et qui indiquait que l'horloge alimentaire ne se trouverait pas dans une seule structure mais reposerait sur le fonctionnement redondant d'un réseau de structures (Angeles-Castellanos *et al.*, 2004 ; Angeles-Castellanos *et al.*, 2005 ; Angeles-Castellanos *et al.*, 2007) : nous pouvions rechercher les éléments de ce réseau par leur activation simultanée, avec une résolution anatomique tout à fait correcte.

Nous avons ainsi identifié plusieurs acteurs potentiels du réseau sous tendant l'horloge alimentaire : les PVT, les IGL, les noyaux arqués (Arc), les PVN, l'aire préoptique médiale (MPO), le cervelet et le NTS (Pereira de Vasconcelos *et al.*, 2006). Certaines de ces structures ont fait l'objet de lésions électrolytiques auparavant : les PVN, les PVT, les IGL et l'Arc (Mistlberger *et Rusak*, 1988 ; Mistlberger, 1994 ; Mistlberger *et Antle*, 1999 ; Landry *et al.*, 2007). Parmi ces lésions, aucune n'abolit la FAA, ce qui n'élimine pas la possibilité non négligeable qu'ils puissent avoir des fonctions redondantes pour l'horloge alimentaire. Il est probable que l'activation des NTS soit consécutive à des messages provenant du système digestif, cette structure en recevant des informations abondantes. Le MPO étant impliqué dans l'homéostasie du glucose (Foscolo *et al.*, 2003), il n'est pas étonnant de voir que cette structure est affectée par une restriction alimentaire. Enfin, le cervelet étant impliqué dans la locomotion, une modification de son métabolisme durant la FAA était attendue. Ceci dit, il n'est pas exclu qu'il puisse jouer un rôle plus important que le simple contrôle de la sortie locomotrice. Une approche similaire du point de vue conceptuel, qui recherchait les structures exprimant c-FOS en anticipation ou durant l'accès à la nourriture, a dégagé elle aussi un certain nombre de structures possiblement impliquées dans le réseau de l'horloge alimentaire (Angeles-Castellanos *et al.*, 2004 ; Angeles-Castellanos *et al.*, 2007. Voir introduction section IV.9.5). Les PVT par exemple, sont identifiés par les deux approches, mais d'autres structures trouvées dans notre étude ne sont pas retrouvées dans les autres et inversement. Le marquage c-FOS identifiant l'activité neuronale nucléaire (Sharp *et al.*, 1988 ; Dragunow *et Faull*, 1989) et la technique du 2-DG détectant plutôt l'activité au niveau des terminaisons présynaptiques (Nudo *et Masterton*, 1986 ; Sharp *et al.*, 1988 ; Kurumaji *et al.*, 1993), il n'est pas incohérent d'observer des divergences de résultats entre ces deux techniques, néanmoins complémentaires.

Ces résultats intéressants rendent cependant difficile la proposition d'un réseau pour l'horloge alimentaire. Ces structures appartiennent à des ensembles bien différents, impliqués dans le contrôle de fonctions très variées. C'est justement l'une des limitations des techniques du 2-DG et du marquage c-FOS : si elles donnent des pistes d'étude, elles ne rendent compte d'aucune hiérarchie entre les structures. Que ces structures aient des fonctions redondantes ou

que les modifications de l'activité de certaines soient la conséquence de l'activation d'autres ne peut pas être déterminé ici.

Le protocole de restriction mis en place ici, bien que tout à fait adéquat pour l'étude de la synchronisation alimentaire, a pu également induire ici une limitation pour l'investigation des structures importantes pour l'horloge alimentaire : en effet, nous avons mesuré les variations de glucose après 3 semaines de restriction, donc dans un état stable. Il est possible que des structures voient leur consommation de glucose modifiée dans la phase dynamique de l'adaptation à la restriction alimentaire, puis reviennent à un état « basal » lorsque l'entraînement est stable. Cela dit, la complexité et la lourdeur d'analyse des résultats pour la technique du 2-DG sont telles qu'il est difficile d'envisager de reproduire cette expérience sur plusieurs jours successifs pour observer les changements dynamiques de consommation de glucose. De plus, la plupart des autres résultats obtenus concernant l'horloge alimentaire sont en conditions stables et sont donc comparables du point de vue méthodologique avec nos résultats.

La lourdeur de mise en place des mesures en 2-DG a introduit une autre limite dans ce travail : nous n'avons pu réaliser les mesures de consommation de glucose qu'à un seul point horaire, à savoir la période durant laquelle s'exprime la FAA, moment auquel nous attendions que les structures impliquées dans son contrôle voient leur consommation de glucose modifiée. Nous gardons à l'esprit qu'une analyse à d'autres points horaires aurait pu nous permettre d'identifier d'autres structures ou d'affiner nos résultats.

Enfin, il faut souligner que si la technique du 2-DG est une technique d'imagerie de choix pour visualiser des phénomènes pathologiques de consommation de glucose (épilepsie par exemple), il était exceptionnel de trouver des variations telles que celles que nous avons observées (30 à 55 %) dans un état stable et non pathologique dans le cerveau d'un rongeur. Nos résultats donnent de nouvelles pistes d'étude et il sera bon d'étudier en détail l'implication possible de chacune des structures, dans un esprit de hiérarchisation, par des lésions ou des techniques moléculaires utilisant les gènes horloges par exemple.

3. PER2, une protéine clé pour la recherche de l'horloge alimentaire.

Deux autres de nos études nous permettent de compléter les résultats obtenus avec le 2-DG. Nous avons démontré que le gène *Per2* était essentiel à l'expression de la composante d'anticipation de la température et de l'activité locomotrice, et entrainé dans la machinerie moléculaire de l'horloge alimentaire (Feillet *et al*, 2006). Nous avons en outre démontré que toutes les structures du cerveau antérieur, si elles expriment l'ARNm pour *Per2*, n'expriment pas systématiquement la protéine PER2 (Feillet *et al*, soumis). La recherche du substrat anatomique de l'horloge alimentaire doit s'appuyer sur ces deux études afin de proposer de nouvelles pistes. Mieda et collaborateurs ont employé une approche intéressante dans ce domaine, recherchant les structures où une expression rythmique de *Per1* ou *Per1* était

observée en réponse à une restriction alimentaire (Mieda *et al.*, 2006). Nous devons aller plus loin dans ce raisonnement : une approche possible serait de rechercher les structures où l'expression de la protéine PER2 est modifiée en réponse à une synchronisation alimentaire. En adéquation avec notre étude sur les mutants *Per*, l'horloge alimentaire doit être une structure qui exprime la protéine PER2, et qui est influencée par une restriction alimentaire. Cette assertion implique que toute structure n'exprimant pas PER2 mais PER1 ne constituerait pas le substrat anatomique de l'horloge alimentaire. Si l'on se réfère aux résultats obtenus pour l'expression centrale des protéines PER1 et PER2 dans le cerveau antérieur de souris en réponse à une restriction calorique, les DMH ne pourraient donc pas renfermer l'horloge alimentaire. Ce résultat réfute donc l'hypothèse de Gooley et collaborateurs qui proposaient cette structure comme une possible horloge alimentaire (Gooley *et al.*, 2006). Par contre, en adéquation avec l'hypothèse proposée pour les rôles différentiels de PER1 et PER2 dans le cerveau antérieur, les DMH pourraient être une région connexe de l'horloge alimentaire, se trouvant soit sur son chemin d'entrée et renforçant les messages synchronisateurs, soit sur la voie de sortie de l'horloge.

Dans notre étude sur l'expression centrale des protéines PER1 et PER2, nous observons que certaines structures comme l'hippocampe ou BLA expriment PER2, mais sont relativement insensibles à la restriction. En revanche, les VMH, CEA ainsi que les PVN, PVT et Arc, déjà identifiés dans notre étude 2-DG, expriment PER2 et répondent à une synchronisation alimentaire. Il est à la fois encourageant et décourageant de constater que des structures familières peuvent être impliquées dans la synchronisation alimentaire : décourageant car la toutes ces structures, à l'exception de CEA, ont déjà été lésées sans révéler la localisation de l'horloge alimentaire. Mais cela est encourageant dans la mesure où l'hypothèse d'un réseau de structures peut une fois de plus être évoqué et qu'il reste donc une multitude de caractéristiques de l'horloge alimentaire à découvrir.

4. Un modèle de réseau pour la synchronisation alimentaire.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse, s'ils ont amené des éléments nouveaux, n'ont certes pas simplifié le modèle possible expliquant la synchronisation alimentaire. Le schéma qui suit vise à éclaircir et résumer certains points de cette histoire. Cependant, étant données les zones d'ombres qui subsistent dans le domaine, il sera probablement amené à être amélioré dans les années à venir :

INFORMATIONS D'ENTREE (disponibilité alimentaire)

Tissus périphériques
Réception par des structures centrales
Réception directe de paramètres métaboliques par l'horloge alimentaire

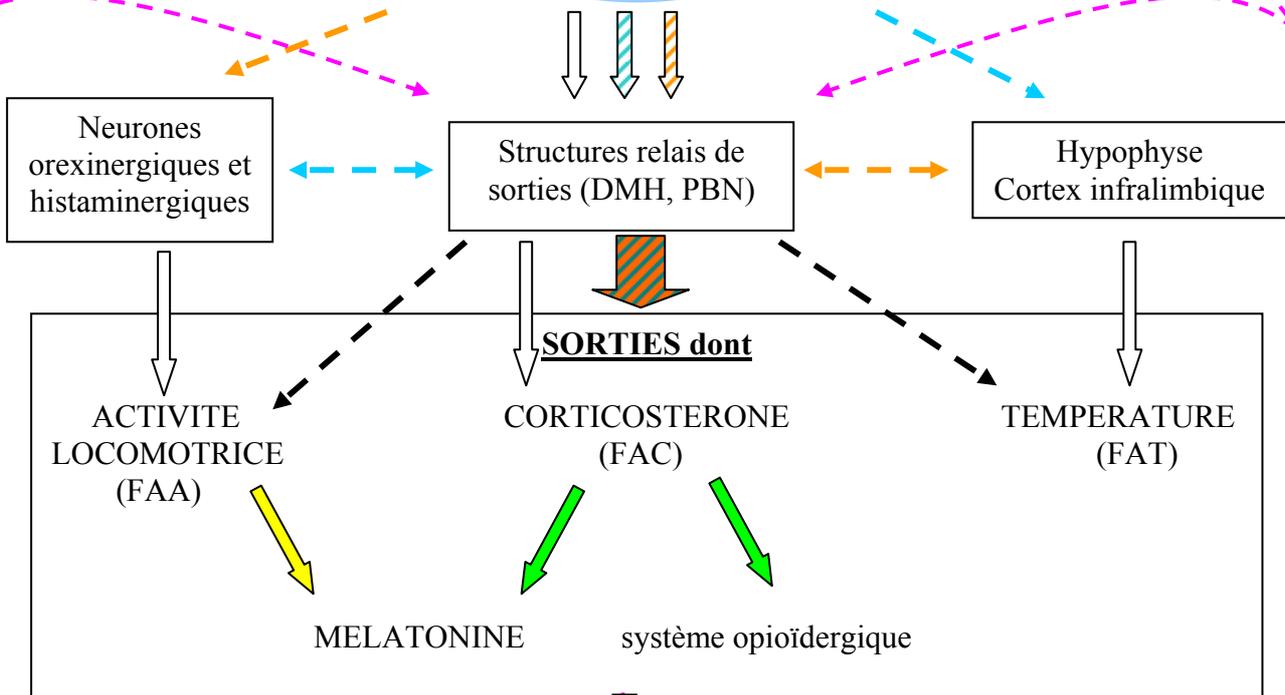
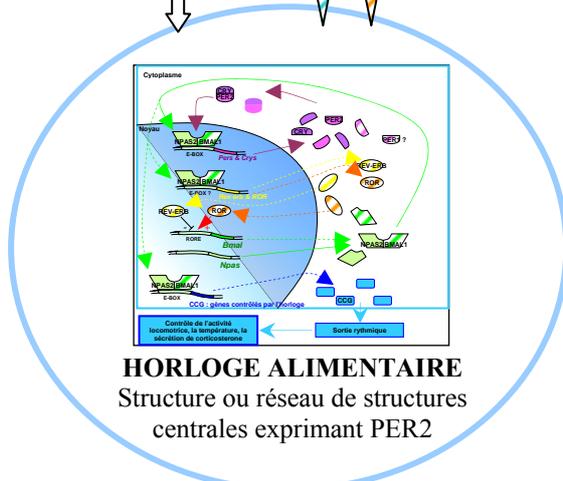
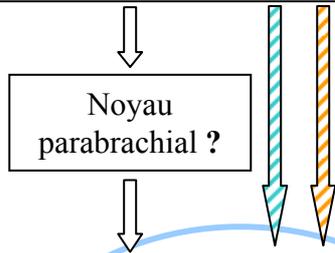


Figure 40 : Modèle du réseau « synchronisation alimentaire ».

Les informations en entrée sont perçues soit par les tissus périphériques, soit par des structures d'entrée vers l'horloge alimentaire, soit par l'horloge alimentaire elle-même. La transmission des facteurs environnementaux relatifs à la disponibilité alimentaire peuvent être transmis à l'horloge alimentaire (s'il n'y a pas de détection directe) via des structures cérébrales (noyau parabrachial) ou directement par voie nerveuse (système noradrénergique : flèches hachurées en orange ; système glutamatergique : flèches hachurées en bleu ; ou autre : flèches blanches). L'horloge alimentaire est une structure ou un réseau de structures, exprimant la protéine PER2. Des structures relais uniques ou multiples transmettent aux sorties les informations générées par l'horloge alimentaire. Il est probable que les neurones orexinergiques et histaminergiques contribuent à l'éveil durant la FAA. Ils peuvent être contrôlés directement par l'horloge alimentaire ou *via* l'un de ses relais. Même remarque pour l'hypophyse et le cortex infralimbique qui semblent contrôler plus spécifiquement la FAT. Les voies noradrénergiques et glutamatergiques servent probablement à la neurotransmission de l'ensemble des messages. Ils ont été représentés comme connexions de manière aléatoire entre les différentes structures, respectivement en orange et bleu. Les sorties primaires de l'horloge alimentaire peuvent rétroagir au niveau central, éventuellement sur l'horloge alimentaire elle-même pour activer d'autres systèmes (mélatonine, système μ -opioïdérique), qui par commodité ont été représentés à la suite des sorties primaires sur le schéma. L'influence de la corticostérone est représentée en vert, et celle de l'activité locomotrice en jaune. Les flèches pointillées roses représentent les rétroactions possibles des sorties au niveau cérébral, sur l'horloge, des relais primaires ou même de nouveaux relais.

V. Nécessité d'une horloge chef d'orchestre : Synchronisation alimentaire versus Horloge alimentaire.

Au cours de ma thèse j'ai été amenée à travailler sur deux concepts, que j'ai souvent superposés : la synchronisation alimentaire et l'horloge alimentaire.

Si la synchronisation alimentaire est obligatoire lorsque l'on parle de l'horloge alimentaire puisque c'est le zeitgeber dominant pour cette horloge, l'inverse n'est pas vrai. En effet, une structure peut être synchronisée par l'accès à la nourriture, sans pour autant renfermer l'horloge alimentaire. Le meilleur exemple est celui des SCN qui peuvent être synchronisés par une restriction calorique (Mendoza *et al.*, 2005c), mais dont la lésion n'altère pas les réponses physiologiques et comportementales à cette même restriction.

Pourtant une question subsiste : la synchronisation alimentaire observée dans la quasi totalité des tissus est-elle une propriété intrinsèque de ceux-ci ? Est-il possible qu'elle soit la conséquence de la synchronisation de l'horloge alimentaire par la nourriture qui redistribue un message donneur de temps à l'ensemble de l'organisme, remettant ainsi les oscillateurs à l'heure, en adéquation avec la disponibilité alimentaire ? Considérant que chez des souris mutantes pour le gène *Per2*, essentiel à l'expression de la FAA, les tissus périphériques sont capables d'être synchronisés par la nourriture (Feillet *et al.*, 2006), nous pourrions penser que la synchronisation alimentaire est une propriété intrinsèque et ne nécessite pas la participation d'une horloge « chef d'orchestre ». Cependant, si une synchronisation alimentaire indépendante d'un comportement anticipatoire a pu être démontrée dans le foie, aucun résultat n'indique qu'il en soit de même pour le système nerveux central : comme démontré dans notre étude sur l'expression de *Cry1* dans le cerveau antérieur en réponse à un nourrissage hypocalorique, des altérations de l'expression des gènes horloges sont observées chez des

souris mutantes pour les gènes *Per* comparées aux WT (Feillet *et al.*, soumis). La synchronisation alimentaire comme propriété intrinsèque serait donc spécifique aux tissus périphériques.

Quelle pourrait être alors l'utilité d'une horloge centrale, si la périphérie peut répondre indépendamment aux pressions alimentaires environnementales ?

Si l'intérêt d'une synchronisation indépendante des tissus périphériques est évidente (synthèse d'enzymes de la digestion en adéquation avec l'heure à laquelle elles sont utiles), sa portée ne peut être que locale. Chez les mutants *Per2*, le foie est parfaitement synchronisé à l'heure du repas ; par contre le comportement n'est pas adapté à cette synchronisation : les souris ne présentent pas de FAA. Dans un environnement naturel, ces animaux ne présenteraient pas de comportement de recherche alimentaire et ne seraient donc probablement pas capables de trouver de la nourriture dans des niches temporelles inhabituelles. Par conséquent, même si les tissus périphériques peuvent être synchronisés de manière indépendante par la nourriture, ils ne sont pas capables de générer et distribuer un message synchronisateur permettant de contrôler les comportements à l'échelle de l'animal entier. Une horloge centrale « chef d'orchestre » est donc indispensable à la réalisation de la totalité des mécanismes de survie de l'animal confronté à un changement de niche temporelle de la disponibilité alimentaire.

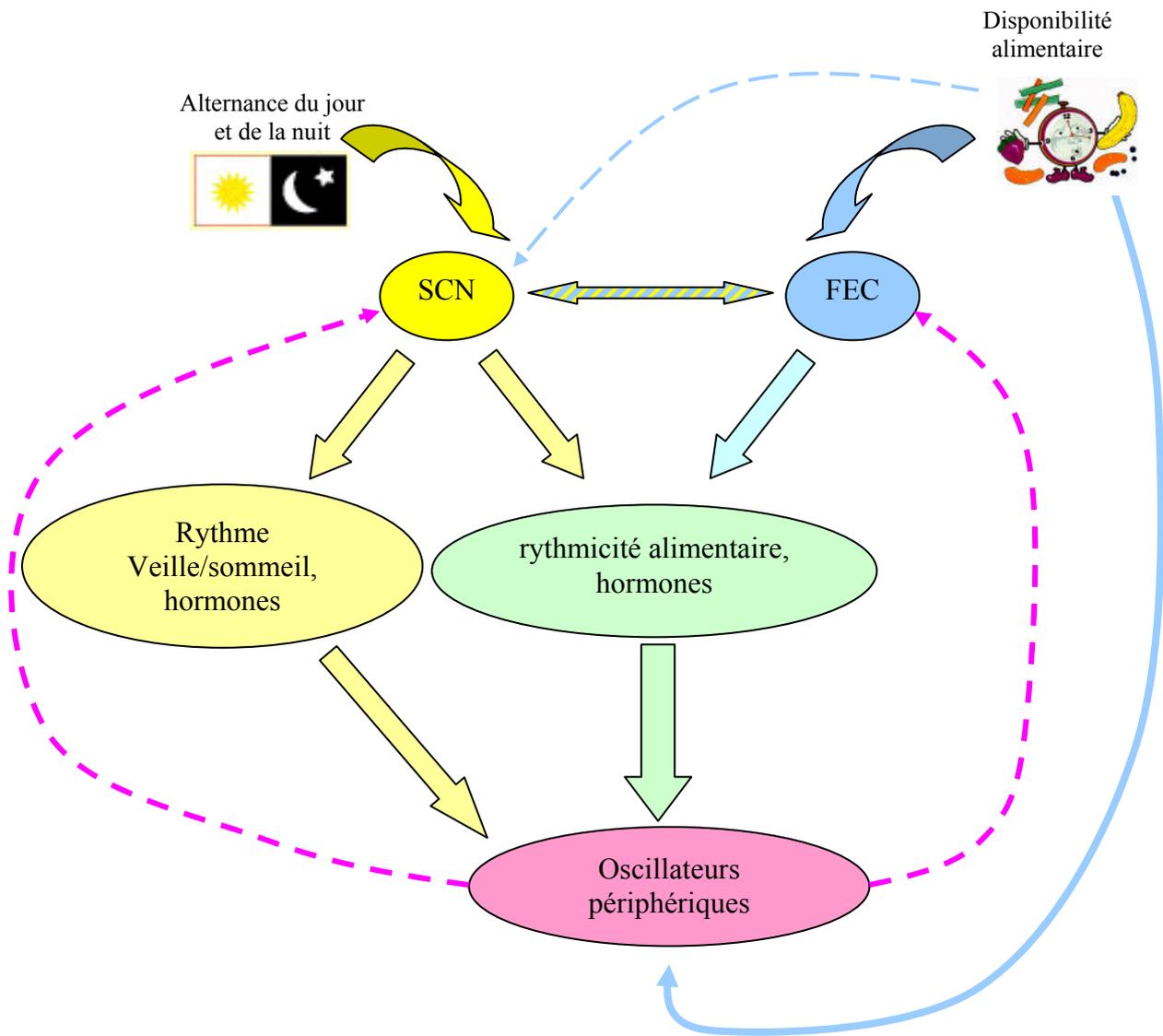


Figure 41 : Schéma bilan du contrôle de la rythmicité alimentaire.

Dans des conditions normales, l'horloge alimentaire (bleu) est couplée (double flèche bleue et jaune) à l'horloge principale des SCN (jaune). La première est sensible aux informations alimentaires (flèche bleue courbe), la seconde est synchronisée par les informations lumineuses (flèche jaune courbe). Elles contrôlent ensemble la rythmicité de l'organisme (flèches pleines jaunes, bleue et verte), transmise vers les tissus périphériques. Si un challenge énergétique survient, l'horloge alimentaire contrôlerait alors seule la rythmicité alimentaire, et les SCN continueraient à transmettre leur message synchronisateur pour rythmer le reste des fonctions physiologiques. Les oscillateurs périphériques seraient à la fois directement sensibles aux informations métaboliques environnementales (flèche bleue étroite), et synchronisés par les deux horloges (flèches verte et jaune). Ils seraient en outre capables de transmettre à leur tour des messages au système nerveux central (flèches roses).

CHAPITRE 5
PERSPECTIVES

En plus des quelques expériences évoquées en discussion, et qui permettraient de préciser certaines questions soulevées par les résultats obtenus au cours de ma thèse, de nouveaux concepts et outils de recherche mis à notre disposition devraient apporter des réponses concernant les mécanismes moléculaires de l'horloge alimentaire ainsi que sur sa localisation.

I. Implication de *Per1* dans la synchronisation alimentaire

Si le rôle de *Per2* dans la synchronisation alimentaire au niveau central a été démontré par nos travaux (Feillet *et al.*, 2006), nos résultats concernant *PER1* indiquent que cette protéine répond à la synchronisation alimentaire et il n'est pas exclu que *Per1* entre dans la machinerie moléculaire de l'horloge alimentaire, non pas au niveau de la génération du message rythmique de sortie de l'horloge, mais pour le renforcement de la synchronisation ou l'adaptation à un nouvel accès à la nourriture après un décalage de phase de l'heure d'accès. Nous savons que dans les SCN, *Per1* et *Per2* sont impliqués dans les avances et les retards de phase induits par la lumière, respectivement. Pourrait-il en être de même pour l'horloge alimentaire ? Une expérience possible pour tester cette hypothèse serait d'entraîner des souris KO pour le gène *Per1* à une restriction alimentaire, puis après avoir atteint un état stable, de réaliser un décalage de l'accès à la nourriture en avançant ou retardant celui-ci de quelques heures. Si notre hypothèse est exacte, les KO *Per1* devraient présenter des anomalies dans la remise à l'heure de l'horloge alimentaire et probablement un comportement altéré par rapport aux souris sauvages dans les mêmes conditions.

II. A la recherche du substrat anatomique de l'horloge alimentaire

Les approches lésionnelles s'étant révélées infructueuses dans la recherche du substrat anatomique de l'horloge alimentaire, les approches utilisant c-FOS ou le 2-DG ne permettant pas d'établir une hiérarchie entre les structures, des approches nouvelles, utilisant des techniques plus récentes sont désormais nécessaires.

1. Horloge centrale ou périphérique ?

S'il est fort probable que l'horloge alimentaire se trouve dans le système nerveux central, aucune preuve absolue n'a été apportée jusqu'ici. Or, nous savons que le gène *Per2* est essentiel au fonctionnement de l'horloge alimentaire. Mais cette hypothèse émane de résultats obtenus chez des souris pour lesquelles le gène *Per2* a été invalidé depuis la naissance dans la totalité des tissus. Une étude plus fine serait nécessaire afin de déterminer dans quels tissus spécifiques l'expression de *Per2* est absolument nécessaire à l'entraînement par la nourriture. Pour ce faire, nous proposons de générer des lignées de souris mutantes pour le gène *Per2* dans un système tissu spécifique, grâce au système CRE-LOX. Dans un premier temps, il

serait intéressant d'étudier la synchronisation alimentaire chez des mutants *Per2* neurones spécifiques, afin de déterminer si le substrat de l'horloge alimentaire est bien neuronal. En association avec cette étude, des mutants *Per2* seulement dans le foie ou les intestins peuvent être utilisés comme contrôles, puisque la synchronisation alimentaire semble normale dans ces tissus chez les mutants *Per2*. Si la nature neuronale du substrat de l'horloge alimentaire est confirmée, nous pourrions alors lancer une étude plus ciblée dans le système nerveux central.

2. Restauration de fonction dans le système nerveux central.

Des recherches récentes en virologie ont développé un outil adéquat pour la recherche de l'horloge alimentaire : les construits lentiviraux. Ces vecteurs basés sur le virus HIV peuvent infecter des cellules post mitotiques tels que les neurones. Modifiés par génie génétique pour exprimer un transgène d'intérêt, et injectés en un site spécifique, ces construits peuvent provoquer une expression soutenue du transgène dans une zone limitée au voisinage du site d'injection, puisqu'ils permettent l'insertion du transgène dans le génome de l'hôte. Cette technique pourrait être adaptée à notre recherche de l'horloge alimentaire. Il serait possible de cloner *Per2* dans un vecteur lentiviral et d'injecter ce construit par stéréotaxie dans des aires cérébrales d'intérêt chez des souris *Per2* mutantes. L'infection stable des cellules neuronales d'une structure chez ces mutants doit restaurer la fonction de la protéine PER2 dans cette structure. Normalement, les mutants *Per2* ne présentent pas de FAA en réponse à une restriction alimentaire. Si la transfection a lieu dans une structure critique pour le fonctionnement de l'horloge alimentaire, la FAA doit être restaurée par l'injection des construits. L'expression stable de la protéine PER2 ainsi que l'étendue anatomique de la restauration de fonction peut être estimée grâce à une immunohistochimie dans les zones proches de l'injection. L'une des premières structures qui devra être testée est les DMH, puisqu'ils ont été proposés comme une horloge alimentaire possible. Les structures pour lesquelles nous avons trouvé une expression rythmique de PER2 en réponse à une restriction calorique peuvent également être des cibles potentielles, ainsi que les structures identifiées par marquage c-FOS ou 2-DG. Une combinaison d'injections, plus lourde techniquement, peut également être envisagée.

Cette approche pourrait permettre de circonscrire le substrat anatomique de l'horloge alimentaire grâce à une approche nouvelle et innovante.

III. Utilisation de souris exprimant un gène rapporteur.

Une autre approche récente a utilisé la modification de l'expression des gènes horloges dans le système nerveux central en réponse à une restriction alimentaire. Cependant, ces analyses, réalisées sur des tissus fixés ou congelés par hybridation *in situ*, mesurent la quantité

d'ARNm à une heure donnée mais ne fournissent pas d'images dynamiques de l'évolution de ces ARNm. Les avancées des techniques portant sur des gènes et protéines rapporteurs type luciférase nous fournissent pourtant un outil permettant d'enregistrer de manière continue la présence d'ARN ou de protéines. Des souris génétiquement modifiées peuvent effectivement exprimer soit la luciférase sous contrôle du promoteur de l'ARNm d'intérêt, rendant compte du rythme de production d'un ARNm, soit une protéine de fusion « protéine d'intérêt / luciférase », rendant compte de la présence de la protéine elle-même. Dans le cadre de l'identification de l'horloge alimentaire, la protéine d'intérêt que nous rechercherons sera la protéine PER2, en tant que protéine de fusion dans un système PER2-Luciférase.

Des souris PER2-Luciférase seront entraînées dans un premier temps de manière stable à une restriction alimentaire, ce qui peut être contrôlé par actimétrie. Les cerveaux seront prélevés et des tranches mises en culture pour observation de l'expression de PER2 dans différentes structures centrales, en comparaison avec des souris nourries *ad libitum*. Ces enregistrements peuvent habituellement être poursuivis durant plusieurs cycles. Nous espérons que les structures impliquées de manière critique dans la synchronisation alimentaire seront grandement affectées par la restriction, alors que d'autres, moins critiques ou indépendantes du phénomène ne seront pas affectées. Également, il est possible d'avoir une vue d'ensemble du système grâce à cette technique et il est probable que la ou les structures constituant l'horloge alimentaire expriment PER2 ensembles, puis transmettent des oscillations à d'autres structures où PER2 sera exprimé plus tard, permettant de hiérarchiser les structures entre elles. Si certaines structures du réseau n'expriment pas PER2 mais PER1, une expérience similaire chez des PER1-Luciférase est envisageable, en association avec la première. Des combinaisons d'expériences chez des souris *Per2* mutantes / PER1 luciférase sont envisageables afin d'affiner ce type d'études.

Des études dans un état dynamique de synchronisation, par exemple en préparant des tranches de cerveaux à différents temps après le début du protocole de restriction pourrait également apporter des informations nouvelles sur le déroulement de la synchronisation alimentaire centrale, en indiquant par exemple que certaines structures réagissent plus tôt que d'autres à cette restriction.

Cette approche, bien que lourde à mettre en place, s'appuie sur des techniques récentes et permettra probablement d'observer en temps réel l'oscillation des structures centrales et d'établir une hiérarchie dans ces réseaux de structures oscillantes.

CHAPITRE 6
RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. Abe M., Herzog E. D., Yamazaki S., Straume M., Tei H., Sakaki Y., Menaker M. and Block G. D. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* **22**, 350-356.
2. Abe H., Honma S., Namihira M., Tanahashi Y., Ikeda M., Honma K. (1998) Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci Lett* **258**, 93-96.
3. Abe H., Kida M., Tsuji K., Mano T. (1989) Feeding cycles entrain circadian rhythms of locomotor activity in CS mice but not in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* **45** 397-401.
4. Abe H., Honma S. and Honma K. (2007) Daily restricted feeding resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R607-15.
5. Abe H. and Rusak B. (1992) Anticipatory activity and entrainment of circadian rhythms in Syrian hamsters exposed to restricted palatable diets. *Am J Physiol* **263**, R116-24.
6. Agez L., Laurent V., Pevet P., Masson-Pevet M. and Gauer F. (2007) Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* **144**, 522-530.
7. 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.
8. Akiyama M., Yuasa T., Hayasaka N., Horikawa K., Sakurai T. and Shibata S. (2004) Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur J Neurosci* **20**, 3054-62.
9. 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.
10. 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.
11. Albus H., Bonnefont X., Chaves I., Yasui A., Doczy J., van der H. o. G. and Meijer J. H. (2002) Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol* **12**, 1130-1133.
12. Amir S., Lamont E. W., Robinson B. and Stewart J. (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* **24**, 781-790.
13. Andre E., Conquet F., Steinmayr M., Stratton S. C., Porciatti V. and Becker-Andre M. (1998) 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.
14. Angeles-Castellanos M., Aguilar-Roblero R. and Escobar C. (2004) c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R158-65.
15. Angeles-Castellanos M., Mendoza J., Diaz-Munoz M. and Escobar C. (2005) Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R678-84.
16. Angeles-Castellanos M., Mendoza J. and Escobar C. (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience* **144**, 344-355.
17. Armario A. and Jolin T. (1986) Effects of water restriction on circadian rhythms of corticosterone, growth hormone and thyroid stimulating hormone in adult male rats. *Physiol Behav* **38**, 327-330.
18. 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.
19. Asai M., Yoshinobu Y., Kaneko S., Mori A., Nikaido T., Moriya T., Akiyama M. and Shibata S. (2001) Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J Neurosci Res* **66**, 1133-1139.
20. Aston-Jones G., Chen S., Zhu Y. and Oshinsky M. L. (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* **4**, 732-738.
21. Avram D., Ishmael J. E., Nevriy D. J., Peterson V. J., Lee S. H., Dowell P. and Leid M. (1999) Heterodimeric interactions between chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor family members ARP1 and ear2. *J Biol Chem* **274**, 14331-14336.

B

1. 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.
2. Bae K., Lee C., Hardin P. E. and Edery I. (2000) dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PER-TIM complex. *J Neurosci* **20**, 1746-1753.
 3. Balsalobre A., Brown S. A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H. M., Schutz G. and Schibler U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344-2347.
 4. Balsalobre A., Damiola F. and Schibler U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929-937.
 5. Bobrzynska K. J. and Mrosovsky N. (1998) Phase shifting by novelty-induced running: activity dose-response curves at different circadian times. *J Comp Physiol* **182**, 251-258.
 6. Bodosi B., Gardi J., Hajdu I., Szentirmai E., Obal F. J. r. and Krueger J. M. (2004) Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, 1071-1079.
 7. Boer G. J., van Esseveldt L. E. and Rietveld W. J. (1998) Cellular requirements of suprachiasmatic nucleus transplants for restoration of circadian rhythm. *Chronobiol Int* **15**, 551-566.
 8. Boulos Z. and Logothetis D. E. (1990) Rats anticipate and discriminate between two daily feeding times. *Physiol Behav* **48**, 523-529.
 9. Boulos Z., Rosenwasser A. M. and Terman M. (1980) Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res* **1**, 39-65.
 10. Brunskill E. W., Witte D. P., Shreiner A. B. and Potter S. S. (1999) Characterization of npas3, a novel basic helix-loop-helix PAS gene expressed in the developing mouse nervous system. *Mech Dev* **88**, 237-241.
 11. Bunker M. K., Wilsbacher L. D., Moran S. M., Clendenin C., Radcliffe L. A., Hogenesch J. B., Simon M. C., Takahashi J. S. and Bradfield C. A. (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009-1017.
- C**
1. Caldelas I., Feillet C. A., Dardente H., Eclancher F., Malan A., Goumelen S., Pevet P. and Challet E. (2005) Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output. *Eur J Neurosci* **22**, 921-9.
 2. Caldelas I., Poirel V. J., Sicard B., Pevet P. and Challet E. (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicantha ansorgei*. *Neuroscience* **116**, 583-591.
 3. Castillo M. R., Hochstetler K. J., Tavernier RJ J. r., Greene D. M. and Bult-Ito A. (2004) Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp* **287**, R551-5.
 4. 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.
 5. Challet E., Malan A. and Pevet P. (1996a) Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neurosci Lett* **211**, 1-4.
 6. Challet E., Pevet P. and Malan A. (1996b) Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci Lett* **216**, 214-218.
 7. Challet E., Pevet P. and Malan A. (1997a) 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.
 8. Challet E., Pevet P., Lakhdar-Ghazal N, Malan A. (1997b) Ventromedial nuclei of the hypothalamus are involved in the phase advance of temperature and activity rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Brain Res Bull* **43**, 209-218.
 9. Challet E, Pevet P, Vivien-Roels B, Malan A. (1997c) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* **12**, 65-79.
 10. Challet E., Solberg L. C. and Turek F. W. (1998) Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol* **274**, R1751-61.
 11. Chemelli R. M., Willie J. T., Sinton C. M., Elmquist J. K., Scammell T., Lee C., Richardson J. A., Williams S. C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T. E., Nakazato M., Hammer R. E., Saper C. B. and Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* **98**, 437-51.
 12. 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.
13. Chik C. L., Ho A. K. and Brown G. M. (1987) Effect of food restriction on 24-h serum and pineal melatonin content in male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* **115**, 507-513.
 14. Clarke J. D. and Coleman G. J. (1986) Persistent meal-associated rhythms in SCN-lesioned rats. *Physiol* **36**, 105-113.
 15. Coleman G. J., Harper S., Clarke J. D. and Armstrong S. (1982) Evidence for a separate meal-associated oscillator in the rat. *Physiol Behav* **29**, 107-115.
 16. Comperatore C. A. and Stephan F. K. (1990) Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access. *Physiol Behav* **47**, 671-678.
 17. Cutrera 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.
 7. Davidson A. J., Poole A. S., Yamazaki S. and Menaker M. (2003) Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* **2**, 32-39.
 8. Davidson A. J. and Stephan F. K. (1998) Circadian food anticipation persists in capsaicin deafferented rats. *J Biol Rhythms* **13**, 422-429.
 9. Davidson A. J. and Stephan F. K. (1999) Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Am J Physiol* **277**, R1376-84.
 10. Davidson A. J., Stokkan K. A., Yamazaki S. and Menaker M. (2002) Food-anticipatory activity and liver per1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav* **76**, 21-26.
 11. Debruyne J. P., Noton E., Lambert C. M., Maywood E. S., Weaver D. R. and Reppert S. M. (2006) A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* **50**, 465-477.
 12. Debruyne J. P., Weaver D. R. and Reppert S. M. (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat* **10**, 543-545.
 13. De Kloet E. R., Vreugdenhil E., Oitzl M. S. and Joels M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* **19**, 269-301.
 14. Diaz-Munoz M., Vazquez-Martinez O., Aguilar-Roblero R. and Escobar C. (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, 2048-2056.
 15. Dragunow M. and Faull R. (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* **29**, 261-265.
 16. Dudley C. A., Erbel-Sieler C., Estill S. J., Reick M., Franken P., Pitts S. and McKnight S. L. (2003) Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* **301**, 379-383.

D

1. Daan S. and Aschoff J. (2001) the entrainment of circadian systems in handbook of behavioural neurobiology, 12 circadian clocks edited by takahashi JS, FW turek and RY moore, kluwer academic / plenum publishers, new york.
2. Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F. and Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* **14**, 2950-2961.
3. Date Y., Ueta Y., Yamashita H., Yamaguchi H., Matsukura S., Kangawa K., Sakurai T., Yanagisawa M. and Nakazato M. (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 748-753.
4. Davidson A. J., Aragona B. J., Houtp T. A. and Stephan F. K. (2001a) Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol* **74**, 349-354.
5. Davidson A. J., Aragona B. J., Werner R. M., Schroeder E., Smith J. C. and Stephan F. K. (2001b) Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiol* **72**, 231-235.
6. Davidson A. J., Cappendijk S. L. and Stephan F. K. (2000) Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp* **278**, R1296-304.
1. Eastman C. I., Mistlberger R. E. and Rechtschaffen A. (1984) Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol* **32**, 357-368.
2. Erbel-Sieler C., Dudley C., Zhou Y., Wu X., Estill S. J., Han T., Diaz-Arrastia R., Brunskill E. W., Potter S. S. and McKnight S. L. (2004) Behavioral and regulatory abnormalities in mice deficient in the NPAS1 and NPAS3 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13648-13653.

E

3. Escobar C., Diaz-Munoz M., Encinas F. and Aguilar-Roblero R. (1998) Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol* **274**, R1309-16.
4. Escobar C., Mendoza J. Y., Salazar-Juarez A., Avila J., Hernandez-Munoz R., Diaz-Munoz M. and Aguilar-Roblero R. (2002) Rats made cirrhotic by chronic CCl4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiol Int* **19**, 1073-1086.
5. Estrada-Rodgers L., Levy G.N., Weber W.W. (1998) Characterization of a hormone response element in the mouse N-acetyltransferase 2 (Nat2*) promoter. *Gene Expr* **7**, 13-24.
8. Filipski E., Innominato P. F., Wu M., Li X. M., Iacobelli S., Xian L. J. and Levi F. (2005) Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *J Natl Cancer Inst* **97**, 507-517.
9. Filipski E., King V. M., Li X., Granda T. G., Mormont M. C., Liu X., Claustrat B., Hastings M. H. and Levi F. (2002) Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer* **94**, 690-697.
10. Foscolo R. B., de Castro M. G., Marubayashi U., dos Reis A. M. and Coimbra C. C. (2003) Medial preoptic area adrenergic receptors modulate glycemia and insulinemia in freely moving rats. *Brain Res* **985**, 56-64.
11. Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P. and Lee C. (2002) The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**, 41-50.

F

1. Feillet C. A., Mendoza J., Albrecht U., Pévet P., Challet E. (soumis) Functional differences of clock components in the mouse forebrain: Brain oscillators ticking with different clock hands.
2. Feillet C. A., Pévet P., Challet E. (en préparation) Corticosterone secretion is not essential for restoration of daily rhythms in pineal melatonin and locomotor activity by restricted feeding in SCN-lesioned rats.
3. Feillet C. A., Ripperger J. A., Magnone M. C., Dulloo A., Albrecht U. and Challet E. (2006) Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. *Curr Biol* **16**, 2016-22.
4. Fernandes P.A., Cecon E., Markus R.P., Ferreira Z.S. (2006) Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res* **41**, 344-350.
5. Ferreira Z.S., Fernandes P.A., Duma D., Assreuy J., Avellar M.C., Markus R.P. (2005) Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res* **38**, 182-188.
6. 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.
7. Filipski E., Delaunay F., King V. M., Wu M. W., Claustrat B., Grechez-Cassiau A., Guettier C., Hastings M. H. and Francis L. (2004) Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Res* **64**, 7879-7885.

G

1. Garidou M. L., Bartol I., Calgari C., Pevet P. and Simonneaux V. (2001) In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience* **105**, 721-729.
2. 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.
3. Gooley J. J., Schomer A. and Saper C. B. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* **9**, 398-407.
4. Granados-Fuentes D., Prolo L. M., Abraham U. and Herzog E. D. (2004) The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* **24**, 615-619.
5. Granados-Fuentes D., Tseng A. and Herzog E. D. (2006) A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *J Neurosci* **26**, 12219-25.
6. Grechez-Cassiau A., Panda S., Lacoche S., Teboul M., Azmi S., Laudet V., Hogenesch J. B., Taneja R. and Delaunay F. (2004) The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J Biol Chem* **279**, 1141-1150.
7. Green D. J. and Gillette R. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* **245**, 198-200.
8. 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.

H

1. Hagan J. J., Leslie R. A., Patel S., Evans M. L., Wattam T. A., Holmes S., Benham C. D., Taylor S. G., Routledge C., Hemmati P., Munton R. P., Ashmeade T. E., Shah A. S., Hatcher J. P., Hatcher P. D., Jones D. N., Smith M. I. and Piper (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10911-10916.
2. Hakansson M. L., Brown H., Ghilardi N., Skoda R. C. and Meister B. (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J* **18**, 559-572.
3. Hamaguchi H., Fujimoto K., Kawamoto T., Noshiro M., Maemura K., Takeda N., Nagai R., Furukawa M., Honma S., Honma K., Kurihara H. and Kato Y. (2004) Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J* **382**, 43-50.
4. Hara J., Beuckmann C. T., Nambu T., Willie J. T., Chemelli R. M., Sinton C. M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M. and Sakurai T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* **30**, 345-354.
5. Hara R., Wan K., Wakamatsu H., Aida R., Moriya T., Akiyama M. and Shibata S. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **6**, 269-278.
6. Harrington M. E. (1997) The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 705-727.
7. 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**, .
8. 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.
9. Hogenesch J. B., Gu Y. Z., Moran S. M., Shimomura K., Radcliffe L. A., Takahashi J. S. and Bradfield C. A. (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci JT - The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, .
10. Holloway WR J. r., Tsui H. W., Grota L. J. and Brown G. M. (1979) Melatonin and corticosterone regulation: feeding time or the light:dark cycle? *Life Sci* **25**, 1837-1842.
11. Honma K. I., Honma S. and Hiroshige T. (1983) Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *Am J Physiol* **245**, R339-44.
12. Honma K., Honma S. and Hiroshige T. (1987a) Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol Behav* **40**, 767-774.
13. Honma S., Honma K. and Hiroshige T. (1989) Methamphetamine induced locomotor rhythm entrains to restricted daily feeding in SCN lesioned rats. *Physiol Behav* **45**, 1057-1065.
14. Honma S., Honma K., Nagasaka T. and Hiroshige T. (1987b) The ventromedial hypothalamic nucleus is not essential for the prefeeding corticosterone peak in rats under restricted daily feeding. *Physiol Behav* **39**, 211-215.
15. 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.
16. Honma S., Kawamoto T., Takagi Y., Fujimoto K., Sato F., Noshiro M., Kato Y. and Honma K. (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. **419**, 841-844.

I

1. Iijima M., Nikaido T., Akiyama M., Moriya T. and Shibata S. (2002) Methamphetamine-induced, suprachiasmatic nucleus-independent circadian rhythms of activity and mPer gene expression in the striatum of the mouse. *Eur J Neurosci* **16**, 921-929.
2. Iijima M., Yamaguchi S., van der Horst G., Bonnefont X., Okamura H. and Shibata S. (2005) Altered food-anticipatory activity rhythm in Cryptochrome-deficient mice. *Neurosci Res* **52**, 166-173.
3. Ikeda M., Yu W., Hirai M., Ebisawa T., Honma S., Yoshimura K., Honma K. I. and Nomura M. (2000) cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res* **275**, 493-502.
4. Inouye S. T. (1982) Ventromedial hypothalamic lesions eliminate anticipatory activities of

- restricted daily feeding schedules in the rat. *Brain Res* **250**, 183-187.
5. Inouye S. T. and Kawamura H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5962-5966.
 6. Inzunza O., Seron-Ferre M. J., Bravo H. and Torrealba F. (2000) Tuberomammillary nucleus activation anticipates feeding under a restricted schedule in rats. *Neurosci Lett* **293**, 139-142.
 7. Ishida A., Mutoh T., Ueyama T., Bando H., Masubuchi S., Nakahara D., Tsujimoto G. and Okamura H. (2005) Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* **2**, 297-307.
 8. Itoh S., Katsuura G. and Hirota R. (1980) Conditioned circadian rhythm of plasma corticosterone in the rat induced by food restriction. *Jpn J Physiol* **30**, 365-375.

J

1. 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

K

1. Kalra S. P., Bagnasco M., Otukonyong E. E., Dube M. G. and Kalra P. S. (2003) Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul Pept* **111**, 1-11.
2. Kalsbeek A., Fliers E., Franke A. N., Wortel J. and Buijs R. M. (2000) Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology* **141**, 3832-3841.
3. Kalsbeek A., Ruiters M., La Fleur S. E., Cailotto C., Kreier F. and Buijs R. M. (2006) The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Prog Brain Res* **153**, 283-307.
4. Kalsbeek A. and Strubbe J. H. (1998) Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. *Physiol Behav* **63**, 553-558.
5. 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.
6. Kamphuis W., Cailotto C., Dijk F., Bergen A. and Buijs R. M. (2005) Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 18-26.
7. Kas M. J., van den B. o. R., Baars A. M., Lubbers M., Lesscher H. M., Hillebrand J. J., Schuller A. G., Pintar J. E. and Spruijt B. M. (2004) Mu-opioid receptor knockout mice show diminished food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci* **20**, 1624-32.
8. 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.
9. Klante G., Secci K., Masson-Pevet M., Pevet P., Vivien-Roels B., Steinlechner S. and Wollnik F. (1999) Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. *Am J Physiol* **276**, R1078-86.
10. Ko C. H. and Takahashi J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R271-7.
11. Kornmann B., Schaad O., Bujard H., Takahashi J. S. and Schibler U. (2007) System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* **5**, .
12. Kramer A., Yang F. C., Snodgrass P., Li X., Scammell T. E., Davis F. C. and Weitz C. J. (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. **294**, 2511-2515.
13. Kraves S. and Weitz C. J. (2006) A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* **9**, 212-219.
14. Krieger D. T. (1974) New studies on the experimental alteration of the circadian periodicity of plasma corticosteroid levels in the rat. *Chronobiologia* **1 Suppl 1**, 82-90.
15. Kurumaji A., Dewar D, McCulloch J (1993) Metabolic mapping with deoxyglucose autoradiography as an approach for assessing drug action in the central nervous system. In: *Imaging drug action in the brain* (London ED, ed), pp 207–246. London: CRC Press.
16. Krieger D. T. (1980) Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology* **106**, 649-654.
17. Kurumiya S., Kawamura H. (1985) Damped oscillation of the lateral hypothalamic multiple unit activity induced by restricted feeding schedules in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. Soc Neurosci.- Society for Neuroscience Abstract 11:817.

L

1. La Fleur S. E., Kalsbeek A., Wortel J. and Buijs R. M. (1999) A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* **11**, 643-652.
2. Lamont E. W., Robinson B., Stewart J. and Amir S. (2005) The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4180-4184.
3. Landry G. J., Simon M. M., Webb I. C. and Mistlberger R. E. (2006) Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1527-34.
4. Landry G. J., Yamakawa G. R. and Mistlberger R. E. (2007) Robust food anticipatory circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* **1141**, 108-118.
5. Larsen P. J. (1999) Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* **46**, 296-304.
6. Lee C., Bae K. and Edery I. (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 5316-5325.
7. 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.
8. Lopez-Molina L., Conquet F., Dubois-Dauphin M. and Schibler U. (1997) The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J* **16**, 6762-6771.
9. 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.
10. Lowrey P. L. and Takahashi J. S. (2004) Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**, 407-441.

M

1. Marchant E. G. and Mistlberger R. E. (1995) Morphine phase-shifts circadian rhythms in mice: role of behavioural activation. *Neuroreport* **7**, 209-212.
2. Marchant E. G. and Mistlberger R. E. (1997) Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res* **765**, 273-282.
3. Martinez-Merlos M. T., Angeles-Castellanos M., Diaz-Munoz M., Aguilar-Roblero R., Mendoza J. and Escobar C. (2004) Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* **181**, 53-63.
4. Masana M. I. and Dubocovich M. L. (2001) Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* **2001**, .
5. Masubuchi S., Kataoka N., Sassone-Corsi P. and Okamura H. (2005) Mouse Period1 (mPER1) acts as a circadian adaptor to entrain the oscillator to environmental light/dark cycles by regulating mPER2 protein. *J Neurosci* **25**, 4719-24.
6. Matsui D., Takekida S. and Okamura H. (2005) Molecular oscillation of Per1 and Per2 genes in the rodent brain: an in situ hybridization and molecular biological study. *Kobe J Med Sci* **51**, 85-93.
7. Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F. and Okamura H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302**, 255-259.
8. Maywood E. S., Mrosovsky N., Field M. D. and Hastings M. H. (1999) Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15211-15216.
9. Maywood E. S., Reddy A. B., Wong G. K., O'Neill J. S., O'Brien J. A., McMahon D. G., Harmar A. J., Okamura H. and Hastings M. H. (2006) Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol* **16**, 599-605.
10. 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.
11. Meijer J. H. (2001) photic entrainment in mammals. in handbook of behavioural neurobiology, 12 circadian clocks edited by takahashi JS, FW turek and RY moore, kluwer academic / plenum publishers, new york.
12. Meijer J. H. and Rietveld W. J. (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic

- circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* **69**, 671-707.
13. Mendoza J.Y., Aguilar-Roblero R., Diaz-Munoz M., Escobar C. (2003) Daily epinephrine but not norepinephrine administration produces anticipatory drinking behavior in rats. *Biological Rhythms Research* **34**, 73-90.
 14. Mendoza J., Angeles-Castellanos M. and Escobar C. (2005a) A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci* **22**, 2855-2862.
 15. Mendoza J., Angeles-Castellanos M. and Escobar C. (2005b) Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behav Brain Res* **158**, 133-42.
 16. Mendoza J., Graff C., Dardente H., Pevet P. and Challet E. (2005c) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* **25**, 1514-1522.
 17. Mendoza J, Pévet P, Challet E (2007) Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. In Press.
 18. Meynard M. M., Valdes J. L., Recabarren M., Seron-Ferre M. and Torrealba F. (2005) Specific activation of histaminergic neurons during daily feeding anticipatory behavior in rats. *Behav Brain Res* **158**, 311-319.
 19. Mieda M., Williams S. C., Richardson J. A., Tanaka K. and Yanagisawa M. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12150-12155.
 20. Mieda M., Williams S. C., Sinton C. M., Richardson J. A., Sakurai T. and Yanagisawa M. (2004) Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. *J Neurosci* **24**, 10493-10501.
 21. Mignot E., Taheri S. and Nishino S. (2002) Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci* **5 Suppl**, 1071-1075.
 22. Miki H., Yano M., Iwanaga H., Tsujinaka T., Nakayama M., Kobayashi M., Oishi K., Shiozaki H., Ishida N., Nagai K. and Monden M. (2003) Total parenteral nutrition entrains the central and peripheral circadian clocks. *Neuroreport* **14**, 1457-1461.
 23. 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.
 24. Mistlberger R. E. (1992) Anticipatory activity rhythms under daily schedules of water access in the rat. *J Biol Rhythms* **7**, 149-160.
 25. Mistlberger R. E. (1993) Effects of scheduled food and water access on circadian rhythms of hamsters in constant light, dark, and light:dark. *Physiol Behav* **53**, 509-516.
 26. Mistlberger R. E. (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* **18**, 171-195.
 27. Mistlberger R. E. and Antle M. C. (1999) Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res* **842**, 73-83.
 28. Mistlberger R. E., Antle M. C., Kilduff T. S. and Jones M. (2003) Food- and light-entrained circadian rhythms in rats with hypocretin-2-saporin ablations of the lateral hypothalamus. *Brain Res* **980**, 161-8.
 29. Mistlberger R. E., Houpt T. A. and Moore-Ede M. C. (1990) Food-anticipatory rhythms under 24-hour schedules of limited access to single macronutrients. *J Biol Rhythms* **5**, 35-46.
 30. Mistlberger R. E. and Mumby D. G. (1992) The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav Brain Res* **47**, 159-168.
 31. Mistlberger R. E. and Rechtschaffen A. (1984) Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav* **33**, 227-235.
 32. Mistlberger R. and Rusak B. (1987) Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: dependence on meal size and nutrient content. *Physiol Behav* **41**, 219-226.
 33. Mistlberger R. E., Rusak B. (1988) Food-anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations. *J Biol Rhythms* **3**: 277-291.
 34. Mogenson G. J., Jones D. L. and Yim C. Y. (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* **14**, 69-97.
 35. 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.
 36. Moore R. Y. and Speh J. C. (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* **150**, 112-116.
 37. Moreira A. C. and Krieger D. T. (1982) The effects of subdiaphragmatic vagotomy on circadian corticosterone rhythmicity in rats

- with continuous or restricted food access. *Physiol Behav* **28**, 787-790.
38. Mrosovsky N. (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc* **71**, 343-372.
 39. Mueller C. R., Maire P. and Schibler U. (1990) DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell* **61**, 279-91.

N

1. Nagoshi E., Saini C., Bauer C., Laroche T., Naef F. and Schibler U. (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**, 693-705.
2. Nakamura W., Honma S., Shirakawa T. and Honma K. (2001) Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* **14**, 666-674.
3. Nelson W., Scheving L. and Halberg F. (1975) Circadian rhythms in mice fed a single daily meal at different stages of lighting regimen. *J Nutr* **105**, 171-184.
4. Nudo R. J. and Masterton R. B. (1986) Stimulation-induced [¹⁴C]2-deoxyglucose labeling of synaptic activity in the central auditory system. *J Comp Neurol* **245**, 553-565.

O

1. 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.
2. Okamura H., Miyake S., Sumi Y., Yamaguchi S., Yasui A., Muijtjens M., Hoeijmakers J. H. and van der H. o. G. (1999) Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* **286**, 2531-2534.
3. Ono M., Shibata S., Minamoto Y. and Watanabe S. (1996) Effect of the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801 on food-anticipatory activity rhythm in the rat. *Physiol Behav* **59**, 585-589.
4. Osborne A. R. and Refinetti R. (1995) Effects of hypothalamic lesions on the body temperature rhythm of the golden hamster. *Neuroreport* **6**, 2187-2192.
5. Oster H., Baeriswyl S., Van Der H. o. G. and Albrecht U. (2003a) Loss of circadian

- rhythmicity in aging mPer1^{-/-}-mCry2^{-/-} mutant mice. *Genes Dev* **17**, 1366-1379.
6. Oster H., Damerow S., Kiessling S., Jakubcakova V., Abraham D., Tian J., Hoffmann M. W. and Eichele G. (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab* **4**, 163-173.
 7. Oster H., van der Horst G. and Albrecht U. (2003b) Daily variation of clock output gene activation in behaviorally arrhythmic mPer/mCry triple mutant mice. *Chronobiol Int* **20**, 683-695.
 8. Oster H., Yasui A., van der Horst G. and Albrecht U. (2002) Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes Dev* **16**, 2633-2638.
 9. Ottenweller J. E., Pitman D. L. and Natelson B. H. (1987) Repeated stress at the same time of day does not mimic timed feeding in its effects on the plasma corticosterone rhythm in rats. *Chronobiologia* **14**, 1-6
 10. Ottenweller J. E., Tapp W. N. and Natelson B. H. (1990) Phase-shifting the light-dark cycle resets the food-entrainable circadian pacemaker. *Am J Physiol* **258**, 994-1000.

P

1. Panda S., Sato T. K., Castrucci A. M., Rollag M. D., DeGrip W. J., Hogenesch J. B., Provencio I. and Kay S. A. (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 2213-2216.
2. Pando M. P., Morse D., Cermakian N. and Sassone-Corsi P. (2002) Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* **110**, 107-117.
3. Paxinos G. & Franklin K. B. J. (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates - Second Edition*. New York: Academic Press.
4. Penicaud L., Larue-Achagiotis C. and Le Magnen J. (1983) Endocrine basis for weight gain after fasting or VMH lesion in rats. *Am J Physiol* **245**, E246-52.
5. Pereira de Vasconcelos A., Bartol-Munier I., Feillet C. A., Gourmelen S., Pevet P. and Challet E. (2006) Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food-anticipatory activity. *Neuroscience* **139**, 741-8.
6. Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Garidou M. L., Wortel J., van der V. I. 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.
7. 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.
8. Peyron C., Tighe D. K., van den P. o. A., de Lecea L., Heller H. C., Sutcliffe J. G. and Kilduff T. S. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* **18**, 9996-10015.
 9. 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.
 10. Pitts S., Perone E. and Silver R. (2003) Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic Clk/Clk mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp* **285**, R57-67.
 11. Poirel V. J., Boggio V., Dardente H., Pevet P., Masson-Pevet M. and Gauer F. (2003) Contrary to other non-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* **120**, 745-755.
 12. 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.
 13. 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.
- entrainment by melatonin. *Science* **219**, 1089-1091.
5. Reeb 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.
 6. Reick M., Garcia J. A., Dudley C. and McKnight S. L. (2001) NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* **293**, 506-509.
 7. Reppert S. M., Godson C., Mahle C. D., Weaver D. R., Slangenaupt 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.
 8. Reppert S. M. and Weaver D. R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935-941.
 9. Ripperger J. A., Shearman L. P., Reppert S. M. and Schibler U. (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* **14**, 679-689.
 10. Rosenwasser A. M., Boulos Z. and Terman M. (1981) Circadian organization of food intake and meal patterns in the rat. *Physiol Behav* **27**, 33-39.
 11. Rosenwasser A. M., Pelchat R. J. and Adler N. T. (1984) Memory for feeding time: possible dependence on coupled circadian oscillators. *Physiol Behav* **32**, 25-30.
 12. Rosenwasser A. M., Schulkin J. and Adler N. T. (1985) Circadian wheel-running activity of rats under schedules of limited daily access to salt. *Chronobiol Int* **2**, 115-119.
 13. Ruan G. X., Zhang D. Q., Zhou T., Yamazaki S. and McMahon D. G. (2006) Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9703-9708.
 14. 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.
 15. Ruis J. F., Talamini L. M., Buys J. P. and Rietveld W. J. (1989) Effects of time of feeding on recovery of food-entrained rhythms during subsequent fasting in SCN-lesioned rats. *Physiol Behav* **46**, 857-66.
 16. Rutter J., Reick M., Wu L. C. and McKnight S. L. (2001) Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* **293**, 510-514.

Q

1. Quintero J. E., Kuhlman S. J. and McMahon D. G. (2003) The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J Neurosci* **23**, 8070-8076.

R

1. Ralph M. R., Foster R. G., Davis F. C. and Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978.
2. Ralph M. R. and Menaker M. (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* **241**, 1225-1227.
3. Recabarren M. P., Valdes J. L., Farias P., Seron-Ferre M. and Torrealba F. (2005) Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity responses to feeding in rats. *Neuroscience* **134**, 1413-1422.
4. Redman J., Armstrong S. and Ng K. T. (1983) Free-running activity rhythms in the rat:

S

1. Sage D., Maurel D. and Bosler O. (2001) Involvement of the suprachiasmatic nucleus in diurnal ACTH and corticosterone

- responsiveness to stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E260-9.
2. Satinoff E. and Prosser R. A. (1988) Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of body temperature, in male rats. *J Biol Rhythms* **3**, 1-22.
 3. Sato F., Kawamoto T., Fujimoto K., Noshiro M., Honda K. K., Honma S., Honma K. and Kato Y. (2004) Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem* **271**, 4409-4419.
 4. Schuhler S., Pitrosky B., Saboureau 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.
 5. Segall L. A., Perrin J. S., Walker C. D., Stewart J. and Amir S. (2006) Glucocorticoid rhythms control the rhythm of expression of the clock protein, Period2, in oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in rats. *Neuroscience* **140**, 753-757.
 6. Semo M., Lupi D., Peirson S. N., Butler J. N. and Foster R. G. (2003) Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci* **18**, 3007-17.
 7. Sharp J. W., Gonzalez M. F., Morton M. T., Simon R. P. and Sharp F. R. (1988) Decreases of cortical and thalamic glucose metabolism produced by parietal cortex stimulation in the rat. *Brain Res* **438**, 357-362.
 8. Shearman L. P., Jin X., Lee C., Reppert S. M. and Weaver D. R. (2000a) Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* **20**, 6269-6275.
 9. Shearman L. P., Sriram S., Weaver D. R., Maywood E. S., Chaves I., Zheng B., Kume K., Lee C. C., van der H. o. G., Hastings M. H. and Reppert S. M. (2000b) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019.
 10. Shearman L. P., Zylka M. J., Reppert S. M. and Weaver D. R. (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **89**, 387-397.
 11. Shearman L. P., Zylka M. J., Weaver D. R., Kolakowski LF J. r. and Reppert S. M. (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**, 1261-1269.
 12. 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.
 13. Shibata S., Liou S. Y., Ueki S. and Oomura Y. (1983) Effects of restricted feeding on single neuron activity of suprachiasmatic neurons in rat hypothalamic slice preparation. *Physiol Behav* **31**, 523-528.
 14. Shibata S., Minamoto Y., Ono M. and Watanabe S. (1994) Aging impairs methamphetamine-induced free-running and anticipatory locomotor activity rhythms in rats. *Neurosci Lett* **172**, 107-110.
 15. Shibata S., Ono M., Fukuhara N. and Watanabe S. (1995) Involvement of dopamine, N-methyl-D-aspartate and sigma receptor mechanisms in methamphetamine-induced anticipatory activity rhythm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **274**, 688-694.
 16. Shibata S., Oomura Y., Kita H. and Hattori K. (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res* **247**, 154-158.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Sokoloff L. and Sokoloff L. (1981) Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system.; The deoxyglucose method: theory and practice. *Fed Proc* **40**; **20**, 137-145.
 20. Sollars P. J., Kimble D. P. and Pickard G. E. (1995) Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. *J Neurosci* **15**, 2109-2122.
 21. Spoelstra K., Albrecht U., van der H. o. G., Brauer V. and Daan S. (2004) Phase responses to light pulses in mice lacking functional per or cry genes. *J Biol Rhythms* **19**, 518-529.
 22. Spruijt B. M., van den B. o. R. and Pijlman F. T. (2001) A concept of welfare based on reward evaluating mechanisms in the brain: anticipatory behaviour as an indicator for the state of reward systems. *Appl Anim Behav Sci* **72**, 145-171.

23. 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.
 24. Steinlechner S., Jacobmeier B., Scherbarth F., Dernbach H., Kruse F. and Albrecht U. (2002) Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. *J Biol Rhythms* **17**, 202-209.
 25. 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.
 26. Stephan F. K. (1981) Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J Comp Physiol A* **143**: 401-410.
 27. Stephan F. K. (1983) Circadian rhythms in the rat: constant darkness, entrainment to T cycles and to skeleton photoperiods. *Physiol Behav* **30**, 451-462.
 28. Stephan F. K. (1984) Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access. *Physiol Behav* **32**, 663-671.
 29. Stephan F. K. (1986) Coupling between feeding- and light-entrainable circadian pacemakers in the rat. *Physiol Behav* **38**, 537-544.
 30. Stephan F. K. (1989) Entrainment of activity to multiple feeding times in rats with suprachiasmatic lesions. *Physiol Behav* **46**, 489-497.
 31. Stephan F. K. (2002) The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* **17**, 284-292.
 32. Stephan F. K. and Becker G. (1989) Entrainment of anticipatory activity to various durations of food access. *Physiol Behav* **46**, 731-741.
 33. Stephan F. K. and Davidson A. J. (1998) Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock. *Physiol Behav* **65**, 277-288.
 34. Stephan F. K., Swann J. M. and Sisk C. L. (1979) Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* **25**, 545-554.
 35. 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.
 36. Stokkan K. A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y. and Menaker M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**, 490-493.
 37. 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.
 38. 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.
- T**
1. 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.
 2. 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 JT - Nature* **389**, 512-516.
 3. Tosini G. and Menaker M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**, 419-421.
 4. 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.
- U**
1. Ueda H. R., Chen W., Adachi A., Wakamatsu H., Hayashi S., Takasugi T., Nagano M., Nakahama K., 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.
 2. Unger J., McNeill T. H., Moxley RT 3. r., White M., Moss A. and Livingston J. N. (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* **31**, 143-157.
- V**
1. Van den Heiligenberg S., Depres-Brummer P., Barbason H., Claustrat B., Reynes M. and Levi F. (1999) The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Life Sci* **64**, 2523-34.

2. Van den Pol AN (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* **191**, 661-702.
3. Van der Horst G., 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.
4. 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.
5. Van Reeth O. and Turek F. W. (1990) Daily injections of triazolam induce long-term changes in hamster circadian period. *Am J Physiol* **259**, R514-20.
6. Velasco A., Cachero TG, Granda TG (1994) Entrainment of circadian rhythms of cholesterol-LDL, corticosterone and motor activity by feeding schedules in rats. *Biological Rhythms Research* **25**: 190-198.
7. 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.
8. Vitaterna M. H., Selby C. P., Todo T., Niwa H., Thompson C., Fruechte E. M., Hitomi K., Thresher R. J., Ishikawa T., Miyazaki J., Takahashi J. S. and Sancar A. (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12114-12119.

W

1. Wachulec M., Li H., Tanaka H., Peloso E. and Satinoff E. (1997) Suprachiasmatic nuclei lesions do not eliminate homeostatic thermoregulatory responses in rats. *J Biol Rhythms* **12**, 226-234.
2. Waddington Lamont E., Harbour V. L., Barry-Shaw J., Renteria Diaz L., Robinson B., Stewart J. and Amir S. (2007) Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. *Neuroscience* **144**, 402-411.
3. Wakamatsu H., Yoshinobu Y., Aida R., Moriya T., Akiyama M. and Shibata S. (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic

nucleus of mice. *Eur J Neurosci* **13**, 1190-1196.

4. Warnecke M., Oster H., Revelli J. P., Alvarez-Bolado G. and Eichele G. (2005) Abnormal development of the locus coeruleus in Ear2(Nr2f6)-deficient mice impairs the functionality of the forebrain clock and affects nociception. *Genes Dev* **19**, 614-625.
5. 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**, 2289-95.
6. Wilkinson C. W., Shinsako J. and Dallman M. F. (1979) Daily rhythms in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin are determined primarily by the time of feeding in the rat. *Endocrinology* **104**, 350-359.
7. Witkovsky P., Veisenberger E., LeSauter J., Yan L., Johnson M., Zhang D. Q., McMahon D. and Silver R. (2003) Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina. *J Neurosci* **23**, 7670-7676.

X

Y

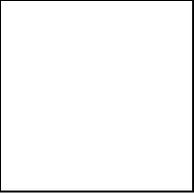
1. Yagita K. and Okamura H. (2000) Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett* **465**, 79-82.
2. Yagita K., Tamanini F., van Der H. o. G. and Okamura H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **292**, 278-281.
3. Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G. D., Sakaki Y., Menaker M. and Tei H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685.
4. Yamazaki S., Straume M., Tei H., Sakaki Y., Menaker M. and Block G. D. (2002) Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10801-10806.
5. Yoo S. H., Ko C. H., Lowrey P. L., Buhr E. D., Song E. J., Chang S., Yoo O. J., Yamazaki S., Lee C. and Takahashi J. S. (2005) A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2608-2613.
6. Yoshida M., Kiyofuji H., Koyanagi S., Matsuo A., Fujioka T., To H., Higuchi S. and Ohdo S. (2006) Glucocorticoid is involved in food-entrainable rhythm of mu-opioid receptor expression in mouse brainstem and analgesic

- effect of morphine. *J Pharmacol Sci* **101**, 77-84.
7. Yoshihara T., Honma S., Mitome M. and Honma K. (1997) Independence of feeding-associated circadian rhythm from light conditions and meal intervals in SCN lesioned rats. *Neurosci Lett* **222**, 95-98.

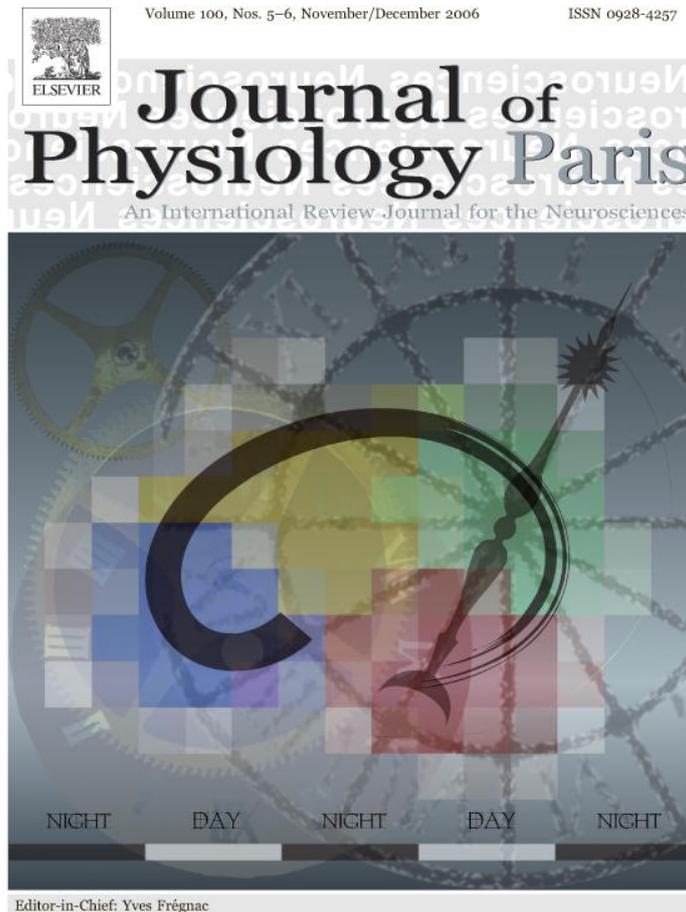
Z

1. Zheng B., Albrecht U., Kaasik K., Sage M., Lu W., Vaishnav S., Li Q., Sun Z. S., Eichele G., Bradley A. and Lee C. C. (2001) Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* **105**, 683-694.
2. 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.
3. Zhou Y. D., Barnard M., Tian H., Li X., Ring H. Z., Francke U., Shelton J., Richardson J., Russell D. W. and McKnight S. L. (1997) Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 713-718.
4. Zigman J. M., Jones J. E., Lee C. E., Saper C. B. and Elmquist J. K. (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* **494**, 528-48.
5. Zylka M. J., Shearman L. P., Levine J. D., Jin X., Weaver D. R. and Reppert S. M. (1998a) Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* **21**, 1115-1122.
6. Zylka M. J., Shearman L. P., Weaver D. R. and Reppert S. M. (1998b) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**, 1103-1110.

CHAPITRE 7
ANNEXES



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



“Feeding time” for the brain: A matter of clocks

Céline A. Feillet ^a, Urs Albrecht ^b, Etienne Challet ^{a,*}

^a *Department of Neurobiology of Rhythms, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, University Louis Pasteur and CNRS, 67084 Strasbourg, France*

^b *Department of Medicine, Division of Biochemistry, University of Fribourg, 1700 Fribourg, Switzerland*

Abstract

Circadian clocks are autonomous time-keeping mechanisms that allow living organisms to predict and adapt to environmental rhythms of light, temperature and food availability. At the molecular level, circadian clocks use clock and clock-controlled genes to generate rhythmicity and distribute temporal signals. In mammals, synchronization of the master circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus is accomplished mainly by light stimuli. Meal time, that can be experimentally modulated by temporal restricted feeding, is a potent synchronizer for peripheral oscillators with no clear synchronizing influence on the suprachiasmatic clock. Furthermore, food-restricted animals are able to predict meal time, as revealed by anticipatory bouts of locomotor activity, body temperature and plasma corticosterone. These food anticipatory rhythms have long been thought to be under the control of a food-entrainable clock (FEC). Analysis of clock mutant mice has highlighted the relevance of some, but not all of the clock genes for food-entrainable clockwork. Mutations of *Clock* or *Per1* do not impair expression of food anticipatory components, suggesting that these clock genes are not essential for food-entrainable oscillations. By contrast, mice mutant for *Npas2* or deficient for *Cry1* and *Cry2* show more or less altered responses to restricted feeding conditions. Moreover, a lack of food anticipation is specifically associated with a mutation of *Per2*, demonstrating the critical involvement of this gene in the anticipation of meal time. The actual location of the FEC is not yet clearly defined. Nevertheless, current knowledge of the putative brain regions involved in food-entrainable oscillations is discussed. We also describe several neurochemical pathways, including orexinergic and noradrenergic, likely to participate in conveying inputs to and outputs from the FEC to control anticipatory processes.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Circadian rhythms; Clock gene; Food synchronisation

1. Introduction

As a consequence of the earth's rotation around the sun and around its axis, all living organisms experience cyclic variations of their environment. Circadian clocks are a way of adapting by anticipating these changes. In mammals, the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN) is the master clock, as demonstrated both by lesion and transplantation studies (Ralph et al., 1990). The SCN is able to elaborate and distribute rhythmic messages of about 24 h to the entire organism (van Esseveldt et al., 2000). These rhythmic signals have been demonstrated to

originate in transcriptional/translational feedback loops involving a set of clock genes (Ko and Takahashi, 2006). Among all cues able to synchronise the SCN to exactly 24 h, the light/dark cycle is the most powerful (photic cues). Nevertheless, the SCN clockwork and its photic responses can be modulated by nutritional cues (Castillo et al., 2004; Challet et al., 2003; Lamont et al., 2005; Mendoza et al., 2005b). Moreover, restricted feeding schedules (Mendoza, 2007; Waddington-Lamont et al., 2007) and other non-photic cues, like methamphetamine administration (Iijima et al., 2002), have also been shown to influence behaviour and physiology outside the SCN. Thus, even if the SCN is undoubtedly the master circadian clock, other brain regions and many other cells around the body express clock genes and are capable of sustained clock gene

* Corresponding author. Tel.: +33 3 88 45 66 93; fax: +33 3 88 45 66 54.
 E-mail address: challet@neurochem.u-strasbg.fr (E. Challet).

oscillations (Welsh et al., 2004; Yoo et al., 2004; Nagoshi et al., 2005). Does this generalized clock gene expression suggest a network of local oscillators commanded by the master SCN, or does it reveal the existence of new central clocks? Considering recent data, we would favour the second possibility.

2. Existence of another clock: the food entrainable clock (FEC)

2.1. The first hints for the existence of the FEC

In 1979, F.K. Stephan and colleagues demonstrated that in rats made arrhythmic by bilateral lesion of the SCN, a circadian bout of locomotor activity can be restored when the animals are submitted to a restricted feeding schedule, i.e. an access to food limited to a certain duration, delivered every day at the same time point. In these conditions, the animals start to run in the hours prior to food access, thus restoring circadian locomotor activity (the so-called the Food Anticipatory Activity: FAA; Stephan et al., 1979). This phenomenon is not limited to activity but is also observed in core body temperature, which rises in the hours preceding food access (Food Anticipatory Thermogenesis), and in plasma corticosterone, which peaks during Food Anticipatory Corticosterone (Mistlberger, 1994). Interestingly, the FAA can be entrained only if food is presented within the circadian range (between 22.5 and 29 h; Stephan and Becker, 1989). Moreover, when food access is shifted, the FAA is progressively shifted to the new feeding time (Stephan, 2002). In addition, it has been established that the FAA is also expressed in animals with an intact SCN housed in constant darkness (DD, e.g. Mistlberger, 1994), or in LD when food is presented during the inactive phase (Castillo et al., 2004; Mendoza et al., 2005b).

All of these clues seem to indicate the existence of another clock, distinct from the SCN and entrained by food: the Food Entrainable Clock (FEC). This clock would have multiple outputs, among which one finds activity (FAA), temperature and corticosterone. Under ad libitum feeding conditions, these outputs would be phase locked to the SCN clock. Under restricted feeding conditions, daily patterns of activity, temperature and plasma corticosterone would result from the influence of both clocks.

2.2. How and where is the FEC ticking?

2.2.1. Functioning of the SCN

It appears that clock mechanisms share common features in all organisms investigated from cyanobacteria to mammals (Wijnen and Young, 2006). They all rely on transcriptional/translational feedback loops involving the so-called “clock genes”. In the past few years, we have learned more and more about the SCN clockwork, and all cellular clocks in mammals seem to work in roughly the same way.

It is now known that circadian oscillations rely on two positive and negative feedback loops. In the main positive loop, two genes *Clock* and *Bmal1* (members of the bHLH-PAS family) are transcribed and translated into proteins that dimerize and activate the transcription of *Period* (*Per*) 1-2-3, *Cryptochrome* (*Cry*) 1-2, *Rev-erb α* , *ror α* genes via E-Box sequences in their promoters (Albrecht and Eichele, 2003; Okamura et al., 2002; Shearman et al., 2000). PER-CRY heterodimers inhibit their own transcription by interacting with the BMAL1/CLOCK dimers (main negative loop) while REV-ERB α directly inhibits Bmal1 transcription (secondary negative feedback loop, Preitner et al., 2002). ROR α acts in the opposite way (secondary positive feedback loop, Akashi and Takumi, 2005; Sato et al., 2004). The CLOCK/BMAL1 dimer is also able to activate the transcription of “clock-controlled genes” (CCG) by interacting with E-Boxes in their promoters. CCG then deliver a rhythmic output to control physiology and behaviour. Among those CCGs, vasopressin and albumin D-site binding protein (DBP) are often taken as phase reference of the SCN (Ko and Takahashi, 2006).

2.2.2. Does FEC function rely on the same genes?

The mutant approach

To assess whether the FEC clockwork relies on the same genes as the SCN, mutant mice for diverse clock genes have been challenged with restricted feeding schedules, hypothesizing that FAA should be expressed if the mutation does not affect FEC functioning; conversely, mutation of a gene that is critical for the FEC should impair FAA expression.

The first gene to be tested in this respect was a member of the positive feedback loop, the *Clock* gene (Pitts et al., 2003). Under regular LD conditions and ad libitum feeding, *Clock* mutants exhibit normal entrainment, but in constant darkness their free running period is lengthened drastically compared to wild-type mice and they become mostly arrhythmic (Vitaterna et al., 1994); note that a single nucleotide transversion in a splice donor site, causing a deletion in the transactivation domain of the CLOCK protein is responsible for this phenotype (King et al., 1997). Given that CLOCK is important for time-keeping in the SCN, it was expected to be involved in food synchronisation. When submitted to a daily 4 h food access in LD and in DD conditions, *Clk/Clk* mutant mice exhibit FAA, even when their circadian wheel-running behaviour is arrhythmic in DD conditions (Pitts et al., 2003). Apparently, the *Clock* gene is not a part of the FEC clockwork. It is noteworthy that *Clock* KO mice have been recently generated (Debruyne et al., 2006). Unlike the *Clock* mutant mice, the KO mice remain rhythmic in DD and free-run with a period similar to WT mice. This result raises the possibility that the *Clock* gene would not be as essential as postulated based on the *Clock* mutant mice phenotype. This finding also questions the results found for the FEC functioning. Until that question is addressed, we would state that the *Clock* gene is not essential for the FEC clockwork.

In 2001, another clock gene was identified as an analogue of *Clock:Npas2* (Reick et al., 2001). It dimerizes with BMALL and is expressed throughout the forebrain. It was suggested to replace CLOCK in its functions outside the SCN. To investigate the possible role of NPAS2 in behavioural manifestations of circadian rhythm, Dudley and colleagues studied locomotor activity and sleep patterns under restricted feeding conditions in *Npas2*-deficient mice (Dudley et al., 2003). When fed ad libitum, locomotor activity in *Npas2*^{-/-} mice is unaffected. In DD, they are perfectly rhythmic with a period slightly shorter than their wild type littermates. Even if their pattern of activity is somewhat different from that of wild-type mice, considering that NPAS2 appears not to be expressed in the SCN, no major alteration in circadian behaviour was to be expected. Furthermore *Npas2*^{-/-} mice were placed under restricted feeding schedules to measure FAA: the results indicate that even if FAA does not disappear in these KO mice, its expression is delayed, indicating that NPAS2 plays a role in adaptability to food restriction. So there may be a slight modification of the molecular feedback loops in the FEC compared to the SCN, including a replacement of CLOCK by its analogue NPAS2.

As mentioned above, the *Cry* genes are essential components of the SCN clockwork, belonging to the main negative feedback loop. The involvement of *Cry* genes has been tested in food anticipatory behaviours (Iijima et al., 2005). If *Cry1* or *Cry2* single mutant mice do not show major defects in circadian behaviour, *Cry1/Cry2* double mutants become arrhythmic upon transfer to DD when fed ad libitum. Their persistent rhythmicity in LD has been interpreted as a masking effect by light (Van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1999). Compared to wild-type littermates, food-restricted *Cry1*^{-/-}/*Cry2*^{-/-} mice expressed a FAA that was less stable and with delayed onset (Iijima et al., 2005). So it seems that the *Cry* genes are not essential for synchronisation to feeding schedules, but rather affect the stability and development of the FAA, being a part of the FEC.

All these studies pointed to modest alterations in the FAA rather than drastic suppression of the FEC output. It is possible that the outputs chosen did not reflect actual defects in the FEC, and that other outputs like corticosterone may have given clear-cut results.

The *Per1* gene, originally cloned by homology to *dPer* in *Drosophila* (Tei et al., 1997), and the *Per2* gene (an homologue of *Per1*) have been demonstrated to be critical for normal synchronisation of the SCN to light (Albrecht et al., 1997, 2001; Shigeyoshi et al., 1997; Spoelstra et al., 2004). With regard to their role in the SCN clock, it seems that not all *Per* genes are equal: normal under LD conditions, *Per1* KO mice are still rhythmic in DD (Cermakian et al., 2001; Zheng et al., 2001) (although another line of *Per1* mutant mice become arrhythmic in similar constant conditions: Bae et al., 2001). Two lines of *Per2* mutant mice become arrhythmic after a few days in DD (Bae et al., 2001; Zheng et al., 1999). Being critical for SCN synchroni-

sation to light, it was possible that *Per* genes would also be responsive to other kinds of synchronizers, e.g. food. We challenged both *Per1* and *Per2* mutant mice with restricted feeding in LD and showed that there is no significant alteration in FAA expression in *Per1* mutant mice (Feillet et al., 2006). Interestingly, *Per2* mutant mice failed to show any anticipation of meal time as assessed by wheel running and general cage activity, whether in LD, DD or LL conditions for three weeks under a temporal restricted feeding schedule, or if only a daily hypocaloric diet is given. In this latter case, mice are provided 66% of their normocaloric intake, given daily at a fixed time point, measured as the average daily intake over 2 weeks of ad libitum feeding. This protocol is known to exert a very powerful effect on the SCN clock whereas restricted feeding alone does not (Mendoza et al., 2005b). Moreover, mice lose about 20% of their initial weight under hypocaloric feeding, as opposed to traditional restricted feeding, where mice usually maintain their weight. Added to the lack of anticipation of meal time in wheel running and general cage activity, the anticipatory bout of temperature rise was also absent in food-restricted *Per2* mutant mice, reinforcing the hypothesis that they demonstrate major impairment of the FEC, as shown by the alteration of two of its outputs (Feillet et al., 2006). These results therefore suggest a critical role of *Per2* but not *Per1* in the molecular regulation of the FEC. Even if not all the clock gene mutants have been challenged with limited access to food, we can nonetheless propose a putative model for the FEC clock, mirroring to some extent that of the SCN (Fig. 1). Afferent and efferent pathways, sensors to and effectors of the FEC have nonetheless yet to be clearly identified, as well as its exact location.

2.3. Location of the FEC

Many hypotheses have been raised concerning the anatomical substrate of the FEC, whether it be a single central structure, a single peripheral organ, or a multi-oscillator system within the central nervous system. Because many peripheral organs such as intestine, kidney or liver express clock genes and can be entrained by restricted feeding schedules (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001), it has been proposed that they might actually be a part of the food-entrainable clock, or constitute the FEC itself.

Experiments on rats made cirrhotic by CCl₄ injection show that the FAA is not abolished in these animals, even though hepatic function is severely altered (Escobar et al., 2002). In addition, in food-restricted *Per1* luciferase rats, FAA does not arise as an output of rhythms in the gastrointestinal system, suggesting that the FEC does not reside in the liver or in other peripheral tissues of the digestive system (Davidson et al., 2003). These organs probably contain outputs of the FEC, or even sensors which indicate the metabolic state of the body to the brain, but the FEC may arise as a central structure or network of structures, that

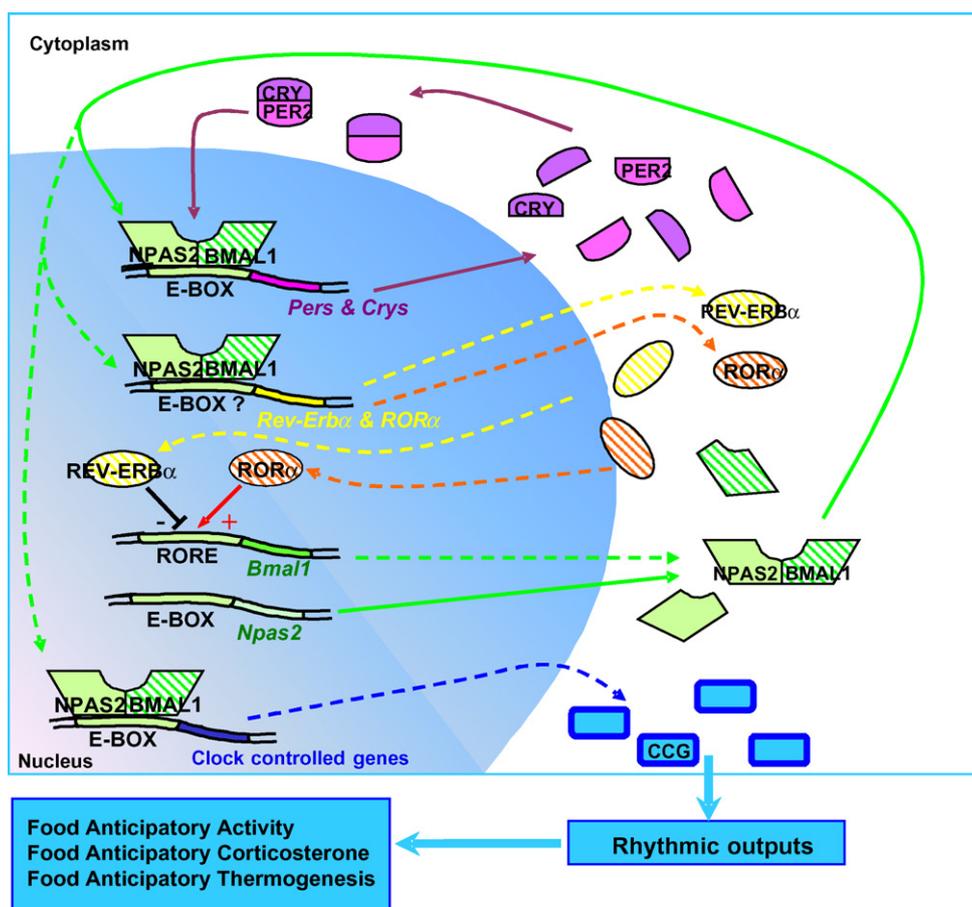


Fig. 1. Putative clockwork of the Food-entrainable Clock (FEC). This scheme represents genes possibly implicated in FEC functioning. So far *Npas2*, *Cry* and *Per2* have been clearly demonstrated to participate in this mechanism. Therefore their proteins and connected arrows are in plain colours. Other genes and proteins shown here, the roles of which are inferred from known mechanisms occurring in the SCN, are represented with hatched colours and dashed arrows. Their involvement in the FEC clock is still speculative and remains to be demonstrated.

receives and integrates information from the periphery, and in turn generates a new temporal message that is distributed to all peripheral organs. It is noteworthy that neither *Per1* nor *Per2* appear to be critically involved in the synchronisation of peripheral organs to meal time (Feillet et al., 2006).

Numerous experiments have been performed to locate this new clock. Speculating it to exist as a single structure in the central nervous system, lesions of the hippocampus (Mistlberger and Mumby, 1992), the neocortex (Mistlberger, 1994), the ventromedial nucleus of the hypothalamus (Mistlberger and Rechtschaffen, 1984), the lateral area and paraventricular nucleus of the hypothalamus (Mistlberger and Rusak, 1988), the arcuate nucleus of the hypothalamus (Mistlberger and Antle, 1999), the area postrema (Davidson et al., 2001a), and the olfactory bulbs (Davidson et al., 2001), have had little if any influence on FAA expression. Interestingly, while complete ablation of the nucleus accumbens does not impair FAA (Mistlberger and Mumby, 1992), specific damage of the core but not the shell reduces the expression of FAA (Mendoza et al., 2005a).

Lesions of the parabrachial nucleus alter both FAA and food anticipatory thermogenesis, but the authors concluded that this structure is a relay for information to or from the FEC rather than constituting the FEC itself (Davidson et al., 2000). Another publication showed a dissociation between FAA and food anticipatory thermogenesis in SCN-lesioned and hypophysectomised rats: the anticipatory rise in temperature was no longer expressed under restricted feeding conditions, whereas FAA was still present. Although this study did not unravel the location of the FEC, it demonstrated the possibility to distinguish different outputs of a same clock (Davidson and Stephan, 1999). This kind of dissociation between food anticipatory variables has also been noted after chemical lesions of the infralimbic cortex, that impair specifically food entrainable thermogenesis, but not FAA (Recabarren et al., 2005).

Lesions of the dorsomedial hypothalamus (DMH) have been shown recently to markedly impair FAA expression (Gooley et al., 2006). In addition, it was demonstrated that *Per1* expression becomes rhythmic in this structure only under restricted feeding (Mieda et al., 2006). In spite of the fact that the DMH may participate in the FEC,

chemical lesions of the DMH also clearly diminish baseline activity (Gooley et al., 2006). Moreover, another recent study showed that FAA persists after electrolytic lesion of the DMH (Landry et al., 2006). Transplantation studies as well as rescue of function will provide more definitive arguments to delineate the actual role of the DMH with respect to food synchronisation.

In light of the contradictory data obtained when lesioning a single central structure, an increasing number of studies suggest that the FEC may result from the combined activity of a network of structures with partially redundant function. This hypothesis was exemplified in studies that measured sustained c-FOS expression in anticipation of meal time in hypothalamic regions like the lateral hypothalamus, perifornical area and DMH, that persisted when food was not provided at the expected time (Angeles-Castellanos et al., 2004). In food entrained rats, c-FOS immunoreactivity was also observed in anticipation to and after meal time in nucleus accumbens, basolateral and central amygdala, in the bed nucleus of the stria terminalis, lateral septum, prefrontal cortex and paraventricular nucleus of the thalamus, but not in the hippocampus (Angeles-Castellanos et al., 2007). This study thus shows the possible involvement of cortico-limbic structures in food synchronisation.

The brainstem receives all the information from the gastrointestinal system. Considering the importance of communication between peripheral organs and central structures, it was of interest to characterize the response of the brain stem to food restriction. It was demonstrated that the expression of c-FOS immunoreactivity was increased after meal time in a number of brainstem nuclei. These increases were no longer detectable if food was not presented at the expected time (Angeles-Castellanos et al., 2005). This work reveals the probable involvement of brainstem structures in conveying food ingestion information to the brain, but not directly in FEC functioning.

Another approach in searching for a network underlying the FEC came from the study of modifications of local cerebral metabolic rate for glucose in response to food restriction at the time of FAA. Glucose utilization was assessed by the 2-deoxyglucose technique in various brain areas in food-restricted rats compared to animals fed ad libitum. It was hypothesized that structures undergoing major changes in their glucose consumption in response to food restriction would play a role in the network underlying the FEC, or at least in FAA expression. The data showed specifically diminished glucose consumption in the intergeniculate leaflets, the paraventricular hypothalamic and thalamic nuclei, the medial preoptic area, the arcuate nucleus, the nucleus of the solitary tract, and the cerebellar cortex in food-restricted rats compared with control animals (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). Taken together, these studies show the complexity of food entrainment and support the hypothesis that the FEC may not reside in a single brain structure. If it is actually a network of structures, it would explain why single lesion

studies failed to localise the site hosting the FEC. Unfortunately, neither c-FOS immunoreactivity nor local glucose utilization address a possible hierarchy in these structures: is there among them a conductor giving tempo to the others, or do they all participate in food-entrained rhythms? This question is still open, and genesis of food-entrainable oscillations will have to be addressed in the coming years.

2.4. Neurochemical pathways involved in the expression of FAA

2.4.1. Glutamatergic, histaminergic and opioidergic pathways

Among the neurochemical systems involved in FAA is the glutamatergic network. Blockade of NMDA receptors reduces the expression of FAA in a dose-dependent manner (Ono et al., 1996). However, this interesting result does not provide specific clues to locate structures involved directly in the FEC because NMDA receptors are so widely expressed in the central nervous system.

Brain histamine is considered to participate in the regulation of feeding behavior. Of interest, histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus have been shown to be activated during FAA (Meynard et al., 2005). Further studies will be helpful to determine whether hypothalamic histaminergic neurons are situated on the afferent or efferent pathways of the FEC network.

The mesolimbic opioid-dopamine system plays a key role in motivated behaviours. Mu-opioid receptor KO mice challenged by restricted feeding display reduced FAA compared to WT, while their dopaminergic system remains unaffected (Kas et al., 2004). These findings therefore indicate that the opioidergic system plays a role in the regulation of FAA.

2.4.2. The orexinergic pathway, an efferent of the FEC promoting FAA

The orexinergic system has also been considered with respect to food anticipation. Orexins (hypocretins) A and B are neuropeptides whose receptors (orexin-1 and orexin-2, receptors) are found mainly in the forebrain, in hypothalamic, thalamic and brainstem nuclei and in spinal cord. Orexinergic neurons are located only in the lateral/perifornical hypothalamic area. They promote locomotor activity, food intake and motivated behaviours, and coordinate sleep/wake patterns. Mice lacking either the orexin gene or orexinergic neurons show phenotypes similar to human narcolepsy. Moreover, central administration of orexin triggers feeding behavior (Mignot et al., 2002). Considering the importance of orexins in the coordination of wakefulness and motivated behaviours like food seeking, Akiyama and colleagues tested activation of orexin neurons (c-FOS immunoreactivity) under RF, and FAA in wild type and orexinergic neuron-ablated mice. Orexinergic neuronal activation is advanced by 6 h in wild type mice in response to daytime RF. Interestingly, FAA is reduced in orexinergic neuron-ablated mice under the same

conditions. It seems that orexinergic neurons would not generate FAA per se, but they would participate in the wakefulness component of FAA (Akiyama et al., 2004). These results were confirmed by another group that studied the involvement of orexin in the establishment and maintenance of FAA induced by restricted feeding (Mieda et al., 2004). Interestingly, activity of orexinergic neurons markedly increases during food anticipation under restricted feeding in wild-type mice (Mieda et al., 2004). Taken together, these studies would suggest that orexin neurons may convey an efferent signal from the FEC, thus increasing wakefulness, and promoting and maintaining FAA in the hours prior to food.

In natural conditions, these neurons may be essential for the animals to express a seeking behaviour in response to a reduction in food availability. However, they would not be the site of the FEC, because neither electrolytic lesions of the lateral hypothalamic area (Mistlberger and Rusak, 1988), nor targeted ablation of orexinergic neurons (Mistlberger et al., 2003) abolish FAA. It is also possible that orexinergic neurons specifically control locomotor output of the FEC. Considering that no data exists on temperature and corticosterone secretion, these two outputs of the FEC

may be expressed normally in such mutants. That question remains to be addressed.

2.4.3. Noradrenergic projections as possible routes from or to the FEC

Ear2 (Nr2f6), COUP-TFI and COUP-TFII are members of a subfamily of orphan receptors involved in the formation of midbrain dopaminergic neurons. Ear2 can homo- or hetero-dimerize with COUP-TFI and COUP-TFII (Avram et al., 1999) and bind to enhancers in the sequence of various genes. *Ear2*^{-/-} mice lack the major part of the locus coeruleus, which provides the majority of noradrenergic transmission in mammals (Warnecke et al., 2005) and contacts a great number of brain structures, particularly in the forebrain. Starting with the observation that *Per* gene expression is dampened in the frontal cortex of *Ear2*^{-/-} mice, it was hypothesized that these mice have a defective circadian timing system in the forebrain. When *Ear2*^{-/-} mice are challenged with restricted feeding, FAA is significantly reduced, concomitant with a drastic reduction of noradrenaline concentration in the frontal cortex (Warnecke et al., 2005). Though the reduction of FAA is obvious in this experiment, noradrenalin

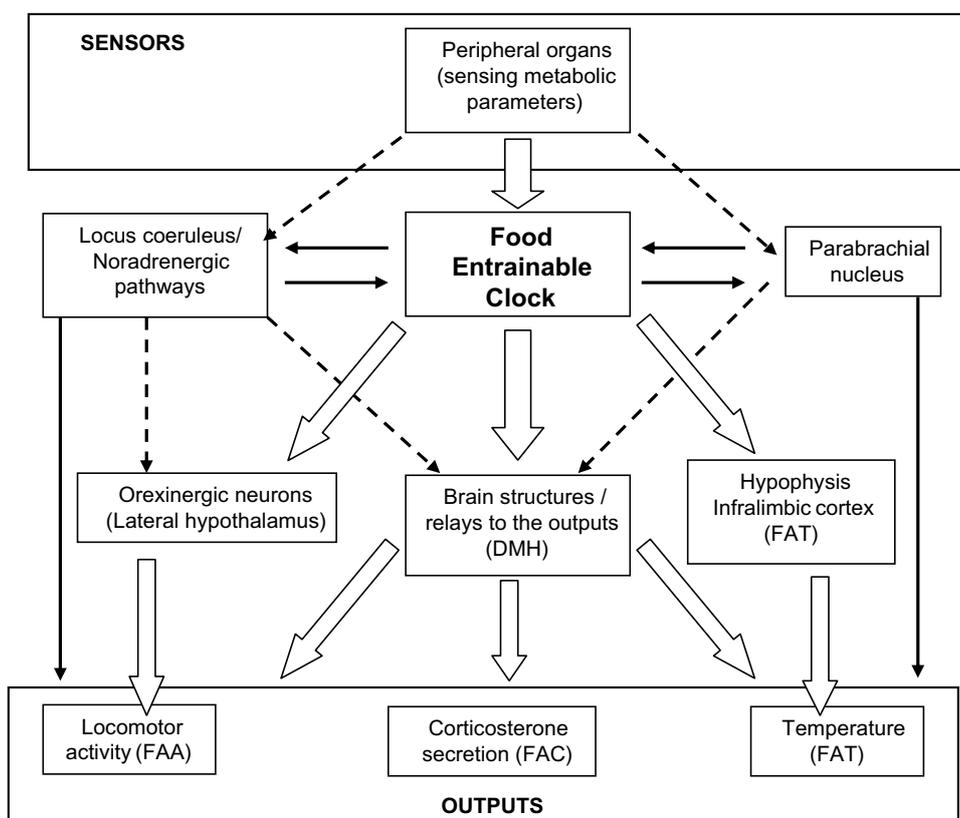


Fig. 2. A model for the Food-entrainable Clock (FEC). This scheme represents the possible network underlying mechanisms related to food synchronisation. Plain open arrows represent demonstrated mechanisms. Plain-line and dashed-line arrows represent probable and more hypothetical pathways, respectively. A central FEC receives information from peripheral organs such as the liver, stomach or intestine. Possible relays (locus coeruleus, parabrachial nucleus) are also connected to the periphery and may deliver redundant messages to the FEC. They can also serve as relay outputs from the FEC. Outputs originating from the FEC are distributed to brain structures that in turn control behavioural and physiological anticipatory outputs. DMH: dorsomedial hypothalamic nuclei, FAA: food anticipatory activity, FAC: food anticipatory corticosterone secretion, FAT: food anticipatory thermogenesis.

may not be the unique transmitter: neurons in the locus coeruleus also express neuropeptides such as vasopressin, galanin and neuropeptide Y, which may be responsible for the observed reduction in frontal cortex rhythmicity and indirectly related to reduced FAA. Moreover no expression of known clock genes could be detected in the locus coeruleus (Warnecke et al., 2005), which would indicate that this structure does not harbour its own clock but constitutes a relay conveying information to the forebrain, possibly from or to the FEC. If this were the case, functional impairment of the locus coeruleus could lead to only partial delivery of inputs to the FEC or incomplete output signals to its effectors, thus resulting in reduction of FAA.

2.5. A possible model for the FEC network

Although the increasing number of studies on the FEC adds complexity to the scheme, they provide new information that allows us to propose a model for the FEC network (Fig. 2).

3. Conclusion

After 30 years of research on the FEC, only the physiological and behavioural outputs of this clock seem to be clearly defined, such as locomotor activity, temperature and corticosterone. As for the FEC itself, it remains a mystery: its exact location, afferent and efferent pathways are still not fully defined. Nevertheless, it seems that the DMH represents a good candidate to be involved in this mechanism, and will certainly be targeted in future work. Orexinergic neurons could provide an output pathway from the FEC, and noradrenergic connexions are probably a part of the FEC network. Recently, much effort has been made to unravel the clockwork that governs the FEC oscillations: especially *Per2*, and to a less critical extent *Npas2* and *Cry* genes, have been implicated in the FEC machinery. Other molecular actors known for their involvement in the SCN have yet to be tested regarding the FEC question.

We should keep in mind that discovering the in and outs of the FEC will open doors for the treatment of feeding rhythm disorders, such as those experienced by shift workers or patients suffering from night-eating syndrome. Their erratic feeding rhythms often lead to obesity, digestive and cardiovascular problems. Hopefully, appropriate synchronisation of feeding rhythms in these patients will alleviate those symptoms.

Acknowledgements

We thank Dr. David Hicks and Dr. Jorge Mendoza for helpful discussions and comments. Part of our work described in this account has been supported by Swiss-French Funds “Programme d’actions intégrées Germaine de Staël”.

References

- Akashi, M., Takumi, T., 2005. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 441–448.
- Akiyama, M., Yuasa, T., Hayasaka, N., Horikawa, K., Sakurai, T., Shibata, S., 2004. Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3054–3062.
- Albrecht, U., Eichele, G., 2003. The mammalian circadian clock. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 271–277.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G., 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., Lee, C.C., 2001. *mPer1* and *mPer2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J. Biol. Rhythms.* 16, 100–104.
- Angeles-Castellanos, M., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C., 2004. *c-Fos* expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, 158–165.
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Diaz-Munoz, M., Escobar, C., 2005. Food entrainment modifies the *c-Fos* expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, 678–684.
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Escobar, C., 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of *c-Fos* and protein *Per1* immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience* 144, 344–355.
- Avram, D., Ishmael, J.E., Nevriy, D.J., Peterson, V.J., Lee, S.H., Dowell, P., Leid, M., 1999. Heterodimeric interactions between chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor family members *ARP1* and *ear2*. *J. Biol. Chem.* 274, 14331–14336.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2001. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525–536.
- Castillo, M.R., Hochstetler, K.J., Tavernier Jr., R.J., Greene, D.M., Bult-Itto, A., 2004. Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, 551–555.
- Cermakian, N., Monaco, L., Pando, M.P., Dierich, A., Sassone-Corsi, P., 2001. Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J.* 20, 3967–3974.
- Challet, E., Caldelas, I., Graff, C., Pevet, P., 2003. Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem.* 384, 711–719.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950–2961.
- Davidson, A.J., Stephan, F.K., 1999. Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Am. J. Physiol.* 277, R1376–R1384.
- Davidson, A.J., Cappendijk, S.L., Stephan, F.K., 2000. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, 1296–1304.
- Davidson, A.J., Aragona, B.J., Houtt, T.A., Stephan, F.K., 2001a. Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol. Behav.* 74, 349–354.
- Davidson, A.J., Aragona, B.J., Werner, R.M., Schroeder, E., Smith, J.C., Stephan, F.K., 2001b. Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiol. Behav.* 72, 231–235.
- Davidson, A.J., Poole, A.S., Yamazaki, S., Menaker, M., 2003. Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* 2, 32–39.
- Debruyne, J.P., Noton, E., Lambert, C.M., Maywood, E.S., Weaver, D.R., Reppert, S.M., 2006. A clock shock: mouse *CLOCK* is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50, 465–477.

- Dudley, C.A., Erbel-Sieler, C., Estill, S.J., Reick, M., Franken, P., Pitts, S., McKnight, S.L., 2003. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* 301, 379–383.
- Escobar, C., Mendoza, J.Y., Salazar-Juarez, A., Avila, J., Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Aguilar-Roblero, R., 2002. Rats made cirrhotic by chronic CCl4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiol. Int.* 19, 1073–1086.
- Feillet, C.A., Ripperger, J.A., Magnone, M.C., Dulloo, A., Albrecht, U., Challet, E., 2006. Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. *Curr. Biol.* 16, 2016–2022.
- Gooley, J.J., Schomer, A., Saper, C.B., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* 9, 398–407.
- Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S., 2001. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6, 269–278.
- Iijima, M., Nikaido, T., Akiyama, M., Moriya, T., Shibata, S., 2002. Methamphetamine-induced, suprachiasmatic nucleus-independent circadian rhythms of activity and mPer gene expression in the striatum of the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 16, 921–929.
- Iijima, M., Yamaguchi, S., van der, H.o.G., Bonnefont, X., Okamura, H., Shibata, S., 2005. Altered food-anticipatory activity rhythm in Cryptochrome-deficient mice. *Neurosci. Res.* 52, 166–173.
- Kas, M.J., van den Bos, R., Baars, A.M., Lubbers, M., Lesscher, H.M., Hillebrand, J.J., Schuller, A.G., Pintar, J.E., Spruijt, B.M., 2004. Mu-opioid receptor knockout mice show diminished food-anticipatory activity. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1624–1632.
- 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., Takahashi, J.S., 1997. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641–653.
- Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15 Spec No. 2, 271–277.
- Lamont, E.W., Diaz, L.R., Barry-Shaw, J., Stewart, J., Amir, S., 2005. Daily restricted feeding rescues a rhythm of period2 expression in the arrhythmic suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 132, 245–248.
- Landry, G.J., Simon, M.M., Webb, I.C., Mistlberger, R.E., 2006. Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, 1527–1534.
- Mendoza, J., 2007. Circadian clocks: setting time by food. *J. Neuroendocrinol.* 19, 127–137.
- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M., Escobar, C., 2005a. Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behav. Brain Res.* 158, 133–142.
- Mendoza, J., Graff, C., Dardente, H., Pevet, P., Challet, E., 2005b. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J. Neurosci.* 25, 1514–1522.
- Meynard, M.M., Valdes, J.L., Recabarren, M., Seron-Ferre, M., Torrealba, F., 2005. Specific activation of histaminergic neurons during daily feeding anticipatory behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 158, 311–319.
- Mieda, M., Williams, S.C., Sinton, C.M., Richardson, J.A., Sakurai, T., Yanagisawa, M., 2004. Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. *J. Neurosci.* 24, 10493–10501.
- Mieda, M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Tanaka, K., Yanagisawa, M., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12150–12155.
- Mignot, E., Taheri, S., Nishino, S., 2002. Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat. Neurosci.* 5, 1071–1075.
- Mistlberger, R.E., 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18, 171–195.
- Mistlberger, R.E., Antle, M.C., 1999. Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res.* 842, 73–83.
- Mistlberger, R.E., Mumby, D.G., 1992. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav. Brain Res.* 47, 159–168.
- Mistlberger, R.E., Rechtschaffen, A., 1984. Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol. Behav.* 33, 227–235.
- Mistlberger, R.E., Rusak, B., 1988. Food-anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations. *J. Biol. Rhythms* 3, 277–291.
- Mistlberger, R.E., Antle, M.C., Kilduff, T.S., Jones, M., 2003. Food- and light-entrained circadian rhythms in rats with hypocretin-2-saporin ablations of the lateral hypothalamus. *Brain Res.* 980, 161–168.
- Nagoshi, E., Brown, S.A., Dibner, C., Kornmann, B., Schibler, U., 2005. Circadian gene expression in cultured cells. *Methods Enzymol.* 393, 543–557.
- Okamura, H., Yamaguchi, S., Yagita, K., 2002. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 309, 47–56.
- Ono, M., Shibata, S., Minamoto, Y., Watanabe, S., 1996. Effect of the noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801 on food-anticipatory activity rhythm in the rat. *Physiol. Behav.* 59, 585–589.
- Pereira de Vasconcelos, A.P., Bartol-Munier, I., Feillet, C.A., Gourmelen, S., Pevet, P., Challet, E., 2006. Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food-anticipatory activity. *Neuroscience* 139, 741–748.
- Pitts, S., Perone, E., Silver, R., 2003. Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic *Clk/Clk* mutant mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, 57–67.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U., 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Recabarren, M.P., Valdes, J.L., Farias, P., Seron-Ferre, M., Torrealba, F., 2005. Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity responses to feeding in rats. *Neuroscience* 134, 1413–1422.
- Reick, M., Garcia, J.A., Dudley, C., McKnight, S.L., 2001. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293, 506–509.
- 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., Hogenesch, J.B., 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527–537.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G., Hastings, M.H., Reppert, S.M., 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013–1019.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., Okamura, H., 1997. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91, 1043–1053.
- Spoelstra, K., Albrecht, U., van der Horst, G., Brauer, V., Daan, S., 2004. Phase responses to light pulses in mice lacking functional per or cry genes. *J. Biol. Rhythms* 19, 518–529.
- Stephan, F.K., 2002. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17, 284–292.
- Stephan, F.K., Becker, G., 1989. Entrainment of anticipatory activity to various durations of food access. *Physiol. Behav.* 46, 731–741.
- Stephan, F.K., Swann, J.M., Sisk, C.L., 1979. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav. Neural Biol.* 25, 545–554.

- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490–493.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M., Sakaki, Y., 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512–516.
- Van der Horst, G., 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., 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., Boer, G.J., 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res. Rev.* 33, 34–77.
- 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., Takahashi, J.S., 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719–725.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S., Sancar, A., 1999. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12114–12119.
- Waddington-Lamont, E., Harbour, V.L., Barry-Shaw, J., Renteria-Diaz, L., Robinson, B., Stewart, J., Amir, S., 2007. Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain. *Neuroscience* 144, 402–411.
- Warnecke, M., Oster, H., Revelli, J.P., Alvarez-Bolado, G., Eichele, G., 2005. Abnormal development of the locus coeruleus in *Ear2(Nr2f6)*-deficient mice impairs the functionality of the forebrain clock and affects nociception. *Genes Dev.* 19, 614–625.
- Welsh, D.K., Yoo, S.H., Liu, A.C., Takahashi, J.S., Kay, S.A., 2004. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.* 14, 2289–2295.
- Wijnen, H., Young, M.W., 2006. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 40, 409–448.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepkka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., Takahashi, J.S., 2004. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13, 5339–5346.
- Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., Bradley, A., 1999. The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400, 169–173.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A., Lee, C.C., 2001. Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105, 683–694.

Résumé

Les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN) sont le siège de l'horloge circadienne principale chez les Mammifères. Ils sont essentiellement synchronisés par les informations d'alternance du jour et de la nuit. Une autre horloge circadienne, l'horloge alimentaire (FEC), dont le substrat anatomique reste inconnu, est quant à elle synchronisée par la disponibilité alimentaire. Mon travail de thèse a consisté en la caractérisation des mécanismes de synchronisation des horloges circadiennes et des oscillateurs centraux et périphériques par les informations alimentaires.

Mon premier axe de recherche portait sur la compréhension des mécanismes d'interprétation des différents messages lumineux, humoraux (mélatonine) et alimentaires par les SCN : nous avons ainsi déterminé qu'une restriction calorique de la disponibilité alimentaire est interprétée par le système circadien comme un accès à la nourriture diurne chez le rat, animal habituellement nocturne.

Mon second axe de recherche visait à préciser le substrat anatomique sous-tendant la synchronisation alimentaire : nous avons recherché dans quelles structures centrales la consommation locale de glucose était modifiée en réponse à une restriction alimentaire (RF) temporelle ou calorique, grâce à la technique du 2-Désoxyglucose. Cette approche originale nous a permis de proposer de nouvelles pistes de recherche quant à la localisation de l'horloge alimentaire, notamment dans les régions thalamiques et hypothalamiques.

Nous avons ensuite cherché à comprendre quelle était l'importance des différentes sorties de la FEC (activité locomotrice, sécrétion de corticostérone) les unes par rapport aux autres : de manière inattendue, notre étude sur des animaux SCN lésés et soumis à une RF a révélé que la sécrétion rythmique de mélatonine par la glande pinéale, sortie jusque là exclusive des SCN, pouvait être contrôlée par l'horloge alimentaire. Ce contrôle est corticostérone-indépendant, mais une augmentation de l'activité locomotrice dans les heures précédant l'accès à la nourriture (FAA) semble nécessaire. De plus, le processus de genèse et de maintien de la FAA est également corticostérone-indépendant.

S'il est connu que le fonctionnement rythmique des SCN repose sur un ensemble de gènes horloges (*Per1-2-3*, *Cry1-2*, *Bmal1*, *Clock*, *Rev-erb*, *Ror*), la machinerie moléculaire sous-tendant le fonctionnement de l'horloge alimentaire était mal définie. Nous avons étudié la synchronisation alimentaire chez des souris mutantes pour les gènes *Per1* et *Per2* : l'activité anticipatoire et le pic anticipatoire de thermogénèse observés chez les souris sauvages dans les heures qui précèdent l'accès à la nourriture, sont absents chez les souris mutantes *Per2*. Par contre, la synchronisation des tissus périphériques est normale chez ces animaux. De plus les paramètres d'activité sont normaux chez des souris mutantes pour le gène *Per1* soumises à une RF. *Per2* est donc un acteur majeur de la synchronisation alimentaire au niveau central et probablement de la machinerie moléculaire sous-tendant le fonctionnement de la FEC.

Considérant l'importance de *Per2* pour la synchronisation alimentaire, nous avons recherché l'expression des protéines PER1 et PER2 dans le système nerveux central, ainsi que leur réponse à une RF. Ces protéines ne sont ni exprimées de manière homogène, ni ne réagissent de manière identique à une RF : l'expression de PER1 est augmentée et celle de PER2 est décalée. De plus, toutes les structures centrales ne sont pas affectées par une RF. Enfin une structure exprimant PER1 et/ou PER2 présente des altérations des oscillations moléculaires (expression de *Cry1*) dans les différentes conditions alimentaires, chez des souris mutantes pour *Per1* ou *Per2* respectivement. Ce travail révèle des oscillateurs centraux fonctionnant avec des acteurs moléculaires différents.

L'ensemble de ces travaux a apporté de nouveaux éléments pour comprendre les mécanismes de la synchronisation alimentaire et ouvrent sur de nombreuses perspectives dans ce domaine.