

**THÈSE**

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR (STRASBOURG I)**

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE

En vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

NEUROSCIENCES

par

**Zeina MALEK**

**Régulation circadienne de la tryptophane  
hydroxylase dans les neurones sérotoninergiques  
du Raphé dorsal et médian chez le Rat**

**Soutenance le 30 mai 2007 devant la commission d'examen :**

**Dr. Olivier Bosler  
Dr. Béatrice Guardiola-Lemaître  
Pr. François Lasbennes  
Dr. Paul Pévet  
Dr. Sylvie Raison**

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

ما لم نفهم عالمَ النوم لن نفهم عالمَ اليقظة...

ميخائيل نعيمة، ومضات " شذور و أمثال "



**A mes chers parents....**

**A mon cher mari....**

**A mon cher pays....**

**Voilà mon cadeau pour vous....**



# REMERCIEMENTS



Je voudrais tout d'abord exprimer tous mes remerciements à **Mireille Masson-Pévet**, qui a accepté que j'effectue mon stage de DEA dans son laboratoire et qui m'a soutenue pour affronter le début de ma thèse, une période qui fut particulièrement difficile. Merci beaucoup Mireille d'avoir cru en mes qualités de chercheur, et d'avoir toujours été à l'écoute pour trouver des solutions et des réponses à mes nombreux problèmes et questions.

Ensuite, je remercie **Paul Pévet**, mon directeur de thèse, qui malgré ses nombreuses responsabilités, a su trouver le temps de suivre mon encadrement scientifique. Durant ces années, j'ai appris à son contact à argumenter mes démarches scientifiques pour défendre mes idées. Merci Paul également pour avoir toujours trouvé le moyen de me rassurer et de m'encourager à assumer mes choix.

Je tiens à remercier **Sylvie Raison** pour son encadrement durant ces cinq années passées sur Strasbourg. Je te remercie Sylvie surtout pour ton temps, ton énergie et pour les moments que nous avons partagés pendant ce long parcours. Tes qualités pédagogiques ont été un facteur important dans ma formation doctorale, et seront pour beaucoup dans ce que je ferai de mon futur.

Je voudrais remercier vivement les membres du jury, **le Dr. Olivier Bosler, le Dr. Béatrice Guardiola-Lemaître et le Pr. François Lasbennes** qui ont eu l'obligeance de s'intéresser à ce travail et de prendre la peine de le juger.

Merci également à **André Malan** pour ses conseils pédagogiques et son aide précieuse en statistiques, à **Daniel Cless et Françoise Eclancher** d'avoir corrigé la syntaxe de mon manuscrit.

Je pense particulièrement à certaines personnes qui, à un moment donné, ont répondu présent pour m'aider, me soutenir et me donner un véritable coup de pouce. Un grand merci à **Etienne Challet** pour ses corrections et ses conseils. Merci également à **Jorge Mendoza** pour les remarques constructives ainsi que pour les nombreux échanges scientifiques pendant 'la pause de 4 h'. Et merci beaucoup à **Hugues Dardente**, d'avoir pris l'initiative de me former en biologie moléculaire et qui en supporte jusqu'à aujourd'hui les conséquences !! Merci à **Patrick Vuillez** pour son soutien et ses conseils.

Je voudrais remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidée pendant mes expériences, je pense particulièrement à **Dominique Ciocca, Daniel Bonn, Aurore Senser et Sylviane Gourmelen**. Je remercie également **Michel Saboureau et Béatrice Bothorel** de m'avoir initiée à la technique de microdialyse.



Je voudrais remercier mes camarades de front en commençant par les anciens combattants : un grand merci à **Laurent**, mon grand frère adoptif et à **Benjamin**, pour les "touchés-coulés" pendant les cours du DEA !!! Merci beaucoup également à **Florent** (le roi du Rugby) et à **Caroline** (la Miss 5-HT !!). Merci à **Céline**, mon dictionnaire personnalisé, à **Laurence**, pour le soutien pendant les coups de blues, et à **Mathieu** pour les échanges scientifiques fructueux.

Comment pourrais-je oublier les anciens doctorants du laboratoire de Neurobiologie des Rythmes au 12 rue de l'université ??? Merci à **Jérôme** de m'avoir initiée à l'étude des IGL, ma structure fétiche !!! à **Marie-Laure** pour l'aide précieuse pendant le DEA (et plus précisément à la veille de l'impression du manuscrit !!!) et à **Vincent-Joseph** pour sa bonne humeur et ses blagues grivoises.

Bon courage et bonne chance aux futurs docteurs !! je pense particulièrement à **Laurent** (je te passe la main), à **Corina**, à **Anthony** et à **Domitille**..

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

Que dire mes chers parents ? mille mercis, toutes les pages de ce manuscrit seront remplies de remerciements et ce ne serait pas assez ; je vais juste vous dire que je n'aurais jamais pu faire cette thèse sans votre aide et vos encouragements. Merci **papa** d'avoir eu confiance en moi, tu peux être fier de ta fille, merci **maman**, ma meilleure copine, pour ton soutien illimité, et puis merci **Maria et Dunia** d'avoir su, pendant toutes ces années, trouver les mots qui m'ont réconfortée.

Et comme on garde la meilleure part pour la fin, un très grand merci à **Nasser**, ma moitié, tu vois..on y arrive enfin et le rêve se réalise après tant d'années de combat. Merci pour ton amour, ton soutien, tes encouragements et ton énergie. Ton implication dans ma thèse était tellement importante que je me demandais parfois si tu ne devrais pas faire de la physiologie au lieu de la chimie !! Et maintenant, c'est à toi de compléter ce parcours.. et que notre rêve se réalise enfin..

# **SOMMAIRE**



<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>A. Les noyaux suprachiasmatiques : Horloge circadienne</b>	<b>23</b>
<b>I. Généralités</b>	<b>24</b>
1. Anatomie des SCN du Rat	24
2. Composition neurochimique	25
<b>II. Genèse des rythmes circadiens</b>	<b>28</b>
1. Bases moléculaires de la rythmicité	28
2. Genèse des rythmes : le couplage	30
<b>III. Distribution du signal circadien</b>	<b>32</b>
1. Sécrétion rythmique des glucocorticoïdes	32
2. L'activité locomotrice : une sortie comportementale	35
<b>B. Remise à l'heure de l'horloge circadienne</b>	<b>38</b>
<b>I. Organisation des principales afférences des SCN</b>	<b>39</b>
1. Les afférences rétiniennes	39
2. Les afférences thalamiques	41
3. Organisation des afférences sérotoninergiques	44
<b>II. Entraînement de l'horloge circadienne</b>	<b>47</b>
1. La lumière	47
2. Les signaux non photiques	49
<b>III. Rôle de la 5-HT dans l'entraînement des rythmes circadiens</b>	<b>51</b>
1. Modulation de l'information photique	51
2. Intégration des informations non photiques	54

<b>C. Les neurones à 5-HT dans le système circadien</b>	<b>57</b>
<b>I. Anatomie des neurones sérotoninergiques impliqués dans le système circadien</b>	<b>57</b>
<b>II. Synthèse de 5-HT</b>	<b>60</b>
1. <i>L'acide aminé L-tryptophane (L-trp)</i>	62
2. <i>La tryptophane hydroxylase (TPH)</i>	64
• <i>Historique</i>	64
• <i>Les Souris déficientes pour le gène tph</i>	65
• <i>L'expression des gènes tph</i>	67
<b>III. Fonctionnement rythmique des neurones sérotoninergiques</b>	<b>69</b>
1. <i>L'activité électrique</i>	69
2. <i>La libération rythmique de 5-HT</i>	71
3. <i>La rythmicité de la TPH</i>	72
<b>D. Objectifs de la thèse</b>	<b>75</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>79</b>
<b>Chapitre I : Profils journaliers des concentrations de protéine tryptophane hydroxylase dans les neurones sérotoninergiques afférents au système circadien</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre II : Étude de l'expression journalière du gène <i>tryptophane hydroxylase-2</i> dans le Raphé médian et dorsal chez le Rat</b>	<b>103</b>
<b>Chapitre III : Glucocorticoïdes, activité locomotrice et expression de l'ARNm de la tryptophane hydroxylase-2</b>	<b>123</b>
• <i>Effets des glucocorticoïdes sur le système sérotoninergique</i>	125
• <i>Effets de l'activité locomotrice sur le système sérotoninergique</i>	128
<b>Chapitre IV : Variations photopériodiques de l'expression du gène <i>tryptophane hydroxylase-2</i> chez le Rat</b>	<b>151</b>

<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>167</b>
<b>A. Fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL</b>	<b>169</b>
<b>B. Régulation de l'expression rythmique du gène <i>tph2</i></b>	<b>175</b>
<b>I. Rythmicité endogène ?</b>	<b>175</b>
<b>II. Rythmicité contrôlée par les SCN ?</b>	<b>175</b>
<i>1. Effecteurs nerveux</i>	<i>175</i>
<i>2. Effecteurs endocrines</i>	<i>176</i>
<i>3. Effecteur comportemental</i>	<i>182</i>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>187</b>



## **ABBREVIATIONS**





**3V**: troisième ventricule  
**5,7-DHT**: 5,7-dihydroxytryptamine  
**5-HIAA**: 5-hydroxyindole acide acétique  
**5-HT**: sérotonine  
**5-HTT**: le transporteur de la sérotonine  
**5-HTP**: 5-hydroxytryptophane  
**8-OH-DPAT**: 8-hydroxy-(dipropylamino)-tétraline  
**AADC**: décarboxylase des acides aminés aromatiques  
**ACTH**: *Adrenocorticotropic Hormone*  
**ADX**: animaux surrenalectomisés  
**ANOVA**: analyse de variance  
**BDNF**: *brain-derived neurotrophic factor*  
**bHLH**: *Basic helix-loop-helix*  
**BMAL1**: *Brain and muscle arnt like protein 1*  
**BSA** : albumine sérique de bœuf  
**CCG**: *clock-controlled gene*  
**CK**: caséine kinase  
**CLC**: *cardiotrophin-like cytokine*  
**CLOCK**: *circadian locomotor output cycles kaput*  
**CNS**: système nerveux central  
**CORT**: animaux surrenalectomisés et traités avec la corticostérone  
**CRF**: *corticotropin Releasing factor*  
**CRY**: *cryptochrome*  
**CT**: temps circadien  
**DAB**: di-amino-benzidine  
**DD**: obscurité constante  
**DLG**: noyau géniculé dorso-latéral  
**DM**: subdivision dorsomédiane du RD  
**DMH**: noyau dorsomédian hypothalamique  
**dmSCN**: région dorsomédiane des SCN  
**EGF**: *epidermal growth factor*  
**GABA**: acide gamma aminobutyrique  
**GFP**: green fluorescent protein  
**GHT**: tractus géniculohypothalamique  
**GLU**: glutamate  
**GR**: récepteurs aux glucocorticoïdes  
**GRE**: glucocorticoids response element  
**GRP**: gastrin releasing peptide  
**HPA**: l'axe hypothalamo-hypophysocorticosurrénalien  
**IA**: Interaural  
**IGL**: feuillet intergéniculé thalamique  
**LAT1/LAT2**: *L-type amino acid transporter1/2*  
**LAT** : subdivision latérale du RD  
**LD**: lumière/obscurité  
**LL**: lumière constante  
**LH**: hypothalamus latéral  
**LH**: hormone lutéinisante  
**LP**: photopériode longue  
**L-trp**: L-tryptophane  
**MAO**: monoamine oxydase  
**mENK**: met-Enképhaline  
**MPOA**: aire préoptique médiane  
**NA**: noradrénaline  
**NAN-190**: 1-(2-methoxyphenyl)-4(4-(2-phtalimido)butyl)piperazine  
**NMDA**: (N-méthyl-D-aspartate)  
**NPY**: neuropeptide Y  
**OC**: chiasma optique  
**OD**: densité optique  
**PACAP**: *pituitary adenylate cyclase activating peptide*  
**PAF**: Paraformaldéhyde  
**PAS**: *period-arnt-sim*  
**PCR**: *polymerase chain reaction*  
**PB**: tampon phosphate  
**PBS**: tampon phosphate salin  
**PER**: *period*  
**PK2**: prokinéticine 2  
**PVN**: noyau paraventriculaire hypothalamique  
**PVT**: noyau paraventriculaire thalamique  
**RD, DR ou DRN**: noyau du Raphé dorsal  
**RHT**: tractus rétinohypothalamique  
**RM, MR ou MRN**: noyau du Raphé médian  
**RN**: noyaux du Raphé  
**ROR**: *retinoic acid-related orphan receptor*  
**RORE**: *retinoic acid-related orphan receptor*  
**SBP**: *serotonin binding protein*  
**SCN**: noyaux suprachiasmatiques  
**SEM**: erreur standard  
**SOM**: somatostatine  
**SP**: photopériode courte  
**SP**: substance P  
**SPZ**: zone subparaventriculaire  
**SSC** : sodium salin citrate  
**TBS**: tampon Tris base salin  
**TGF $\alpha$** : *transforming growth factor alpha*  
**TPH**: tryptophan hydroxylase  
**TrkB**: tyrosine kinase B  
**TTX**: tétrodontoxine  
**Tz**: triazolam  
**VIP**: vasoactive intestinal polypeptide  
**VIPR2**: récepteurs du VIP  
**VLG**: noyau géniculé ventro-latéral  
**vSCN**: région ventrolatérale des SCN  
**VM**: subdivision ventromédiane du RD  
**VMH**: noyau ventromédian hypothalamique  
**VP**: vasopressine  
**WAY 100635**: N-[2[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide trihydrochloride  
**ZT**: zeitgeber time



# **INTRODUCTION**



## *Préface*

Dans la nature, de nombreux phénomènes cycliques (la rotation de la terre sur elle-même et autour du soleil, le cycle lunaire) entraînent des variations considérables dans l'environnement, qu'il s'agisse de la température, de la luminosité, de l'hygrométrie ou encore de la disponibilité alimentaire. Dans leur milieu naturel, tous les êtres vivants sont soumis à ces variations cycliques et doivent, pour leur survie, présenter un fonctionnement rythmique en phase anticipant ainsi les changements de l'environnement.

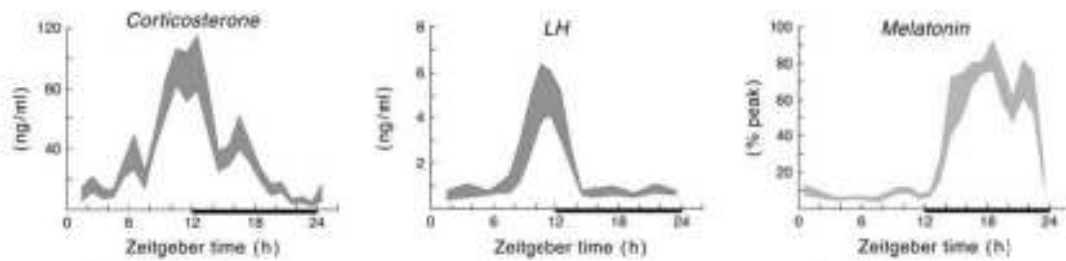
La rythmicité est donc une propriété fondamentale de la matière vivante. Un rythme biologique se définit comme la variation périodique ou cyclique d'un paramètre physiologique, biochimique ou comportemental. Les rythmes biologiques répondent à plusieurs caractéristiques telles que la période, le niveau moyen, l'amplitude et la phase. Chaque fluctuation rythmique présente une acrophase et une bathyphase correspondant respectivement au maximum et au minimum de la variation sur une échelle de temps. La classification la plus couramment utilisée est basée sur la période des rythmes, c'est à dire l'intervalle de temps séparant l'apparition de deux phénomènes identiques. Ainsi, on distingue des rythmes de haute, de moyenne et de basse fréquence.

**Les rythmes ultradiens** ont une période inférieure à 20 h et un déroulement qui ne peut être mis en relation avec aucune variation environnementale cyclique connue. L'alternance du sommeil lent et paradoxal, le rythme de la fréquence cardiaque et celui de la respiration en sont des exemples. Sur le plan endocrine, la sécrétion des hormones hypothalamiques, hypophysaires ou même celle des glandes endocrines périphériques s'effectue sur un mode pulsatile avec une période de l'ordre de quelques minutes à quelques heures. Pendant la journée, nous alternons des phases d'éveil actif au cours desquelles nous sommes très vigilants, et des phases d'éveil passif au cours desquelles nous sommes beaucoup moins efficaces. Ces rythmes peuvent influencer nos fonctions biologiques et ainsi jouer un rôle important dans nos performances physiques et cognitives.

**Les rythmes infradiens** sont des rythmes lents dont la période est supérieure à 24 h. Ils peuvent être mensuels, saisonniers ou annuels. Des rythmes mensuels, tels que le cycle de menstruation chez la femme, sont des phénomènes à périodicité infradienne. Des rythmes saisonniers, bi-annuels et annuels sont également repérables chez l'homme; on peut citer par exemple les signes dépressifs minimes survenant chaque année à la même période, les besoins plus importants de sommeil ou encore une sensibilité accrue aux infections en hiver.

Enfin, de nombreuses espèces présentent un rythme saisonnier de la fonction de reproduction, permettant la naissance des petits pendant la saison la plus favorable à leur survie. Ces rythmes représentent une stratégie adaptative essentielle pour la survie des espèces.

**Les rythmes circadiens** ont une période d'environ 24 h (Figure 1). Chez les mammifères, le cycle veille/sommeil (activité/repos), la sécrétion endocrine (mélatonine, glucocorticoïdes, hormone lutéinisante), certains marqueurs métaboliques (glucose, leptine) ou encore certains comportements (prise alimentaire, activité locomotrice) présentent une rythmicité journalière. Dans l'environnement naturel, ces rythmes sont synchronisés par le cycle lumière/obscurité permettant ainsi d'ajuster le fonctionnement de l'organisme à exactement 24 h.



*Figure 1 : Exemples de rythmicité endocrine : La sécrétion de Corticostérone, de LH (hormone lutéinisante) et de Mélatonine présentent des variations nyctémérales chez le Rat.*

*D'après Kalsbeek & Buijs, 2002.*

Tous les rythmes biologiques répondent à la nécessité de préparer l'organisme vivant pour faire face aux contraintes du milieu externe. Ainsi, l'activité biologique cyclique retrouvée depuis les bases moléculaires de la vie jusqu'aux fonctions physiologiques les plus intégrées, constitue un véritable avantage adaptatif. Ce phénomène permet à l'organisme de s'adapter aux variations environnementales par anticipation des périodes de contraintes maximales. Par exemple, sur une échelle de 24 h, l'homme anticipe sa phase d'activité sur le plan endocrino-métabolique dès la phase du repos, ceci se manifeste notamment par le fonctionnement rythmique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénalien.

**Si les êtres vivants sont capables de repérer et d'anticiper les situations environnementales nouvelles, c'est qu'ils doivent posséder un (ou plusieurs) système de mesure de temps.**

## A. Les noyaux suprachiasmatiques : Horloge circadienne

Les noyaux suprachiasmatiques (SCN, *suprachiasmatic nuclei*) sont le siège de l'horloge circadienne principale des mammifères. En 1972, deux équipes ont montré que la lésion de la région hypothalamique contenant les SCN aboutissait à une perte de rythmicité de l'activité locomotrice et de la sécrétion de corticostérone (Stephan & Zucker, 1972 ; Moore & Eichler, 1972). Les premières expériences de transplantation de greffon de SCN chez les animaux ayant eu au préalable une lésion de ces noyaux, ont apporté davantage de preuves concernant le contrôle des fonctions rythmiques par l'horloge. En effet, chez ces animaux lésés puis greffés, la rythmicité de l'activité locomotrice et du comportement dipsique est restaurée (Lehman *et al.*, 1987).

Sur le plan électrophysiologique, les premiers travaux réalisés *in vivo* chez le Rat ont démontré que les neurones des SCN présentent une activité électrique rythmique avec un niveau d'activité plus élevé pendant le jour (Inouye & Kawamura, 1979). De plus, la même étude montre que cette rythmicité est maintenue lorsque la région des SCN est expérimentalement séparée des structures environnantes. Quelques années plus tard, la mise en évidence d'une activité électrique rythmique des neurones des SCN enregistrés *in vitro*, a pu confirmer le caractère intrinsèque des oscillations circadiennes observées (Green & Gillette, 1982 ; Groos & Hendriks, 1982).

L'horloge des SCN répond aux variations cycliques de l'environnement externe et plus particulièrement au cycle jour/nuit. En condition d'alternance lumière/obscurité (LD12:12, pour *light 12 h :dark 12 h*), la période de cette horloge est ajustée à 24 h correspondant à un jour solaire. En revanche, en condition d'isolement temporel, obscurité ou lumière constante (DD ou LL), l'horloge des SCN conserve son fonctionnement rythmique et exprime progressivement sa propre période, dite période endogène, différente de 24 h. Ce phénomène est appelé le libre cours. Cette horloge est ainsi appelée "circadienne", un terme emprunté au latin et signifiant : *Circa* : environ ; *Dies* : jour. En condition de libre cours, le cycle de 24 h est divisé conventionnellement en deux phases : un jour subjectif et une nuit subjective. Dans les SCN, un ensemble de facteurs de transcription s'exprime rythmiquement et reflète la période endogène. Ces oscillations sont à l'origine de la rythmicité aussi bien de l'activité électrique des neurones des SCN que de celle des fonctions physiologiques et comportementales.



**L'horloge circadienne présente dans les SCN est entraînée par l'alternance jour/nuit, génère des rythmes circadiens et est responsable de l'organisation rythmique de nombreuses fonctions physiologiques et comportementales.**

## **I. Généralités**

Dans un premier temps, l'organisation anatomique des SCN sera brièvement décrite. Puis nous présenterons les principaux neuropeptides exprimés dans les SCN ainsi que leurs rôles dans la rythmicité circadienne.

### **1. Anatomie des SCN du Rat**

Les SCN sont une structure hypothalamique paire localisée au-dessus du chiasma optique. Ces noyaux sont situés de part et d'autre du troisième ventricule et s'étendent depuis l'hypothalamus antérieur jusqu'à l'aire rétrochiasmatic. L'extension rostro-caudale des SCN est ovale, mesure environ 700-900  $\mu\text{m}$  et leur diamètre moyen est de 300-400  $\mu\text{m}$ . Chaque noyau des deux SCN est composé de 8000 à 10000 neurones de petite taille, puisque leur diamètre moyen est de l'ordre de 7-10  $\mu\text{m}$  (van den Pol, 1980). Cependant, les prolongements dendritiques de ces cellules nerveuses sont particulièrement étendus et peuvent atteindre 250  $\mu\text{m}$ . Des études morphologiques ont mis en évidence une régionalisation anatomique des SCN en deux subdivisions : ventrolatérale (vlSCN, aussi appelée *Core*) et dorsomédiane (dmSCN, *Shell*). La densité des neurones des SCN dans ces deux parties semble être différente : 43 % des neurones des SCN se trouvent dans la partie vlSCN alors que le dmSCN en contient 57 %. La nature des contacts cellulaires dans la partie dmSCN révèle une forte proportion d'apposition somato-somatique tandis que celle de la partie vlSCN est majoritairement axo-somatique et dendro-dendritique (Guldner & Wolff, 1996 ; Leak *et al.*, 1999). Les SCN contiennent également de nombreuses cellules gliales, il s'agit notamment des astrocytes qui communiquent entre eux *via* les jonctions GAP qui seraient impliquées dans le couplage des oscillateurs neuronaux (Prosser *et al.*, 1994). L'étude des projections commissurales des SCN a mis en évidence une communication entre les deux régions ventrolatérales et dorsomédianes (Moore *et al.*, 2002). De plus, chaque noyau renferme un réseau de communications synaptiques particulièrement complexe entre les deux subdivisions qui le constituent (Romijn *et al.*, 1997).

## 2. Composition neurochimique

L'existence d'une régionalisation des SCN se retrouve aussi bien sur le plan morphologique que neurochimique. En effet, les SCN renferment une composition peptidergique particulièrement diversifiée dans chacune des deux régions anatomiques (pour revue voir van Esseveldt *et al.*, 2000 ; Morin & Allen, 2006). Les profils d'expression de ces peptides sont souvent rythmiques et en fonction de leur localisation (vlSCN ou dmSCN), leurs rôles peuvent être différents.

Les neurones de la partie dorsomédiane des SCN expriment le peptide Arginine Vasopressine (**VP ou AVP**, Van den Pol & Tsujimoto, 1985 ; Card *et al.*, 1988 ; Figure 2). L'expression de VP et de son ARNm est circadienne et leurs profils rythmiques sont maintenus en obscurité constante (Uhl & Reppert, 1986 ; Tominaga *et al.*, 1992b ; Dardente *et al.*, 2004). *In vitro*, l'application de VP sur des tranches hypothalamiques contenant les SCN, entraîne une augmentation de l'amplitude de la décharge neuronale (Mihai *et al.*, 1994).

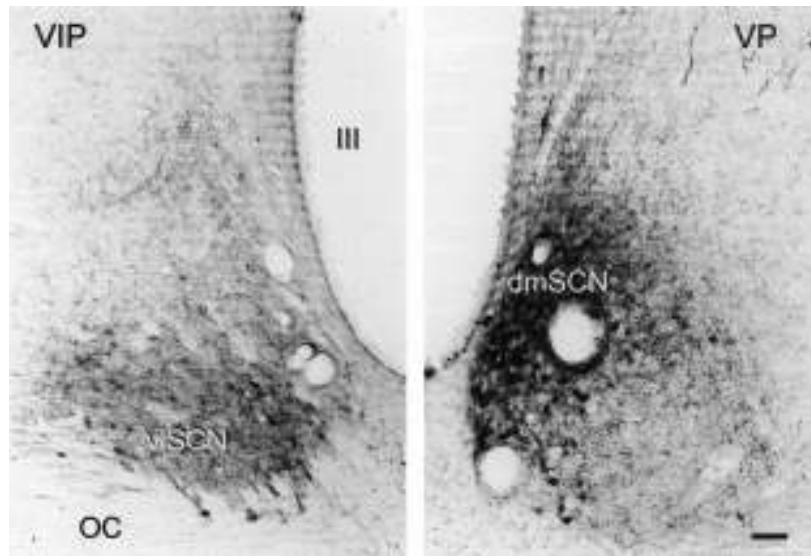


Figure 2 : Illustration de la régionalisation morphologique des SCN : La subdivision ventrolatérale (vlSCN, à gauche) contient principalement des neurones VIPergiques, tandis que la subdivision dorsomédiane (dmSCN, à droite) renferme des neurones VPergiques. OC : Chiasma optique ; III : Troisième ventricule. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. D'après van Esseveldt *et al.*, 2000.

Les neurones de la région ventrolatérale contiennent le *Vasoactive Intestinal Polypeptide* (**VIP**, Card *et al.*, 1981, Figure 2) dont les niveaux d'ARNm et de protéine sont rythmiques chez le Rat en LD mais pas en obscurité constante (Takahashi *et al.*, 1989 ; Okamoto *et al.*, 1991). D'un point de vue fonctionnel, l'injection du peptide VIP dans les SCN chez de Hamsters placés en obscurité constante, entraîne des déphasages de leur activité locomotrice similaires à ceux provoqués par un flash de lumière (Piggins *et al.*, 1995). Le VIP serait donc impliqué dans la synchronisation lumineuse. Par ailleurs, la transmission VIPergique semble être nécessaire pour la rythmicité et le couplage des neurones des SCN, comme a pu le montrer l'étude des Souris dépourvues du récepteur du VIP, le VIPR2. En effet, chez ces Souris, la proportion des neurones rythmiques dans les SCN diminue considérablement (30 % pour les Souris *Vipr2*<sup>-/-</sup> contre 70 % pour les Souris sauvages) et de plus les neurones qui conservent le caractère rythmique ne sont plus synchrones mais déchargent à des périodes sensiblement différentes (Harmar *et al.*, 2002).

En plus du VIP, d'autres neuropeptides sont présents dans la région ventrolatérale des SCN (Figure 3). La présence des neurones contenant le **GRP** (*Gastrine Releasing Peptide*, Mikkelsen *et al.*, 1991) a été mise en évidence dans cette région. Chez le Rat, la rythmicité du GRP n'est pas maintenue en obscurité constante, laissant présager une régulation de son expression par la lumière (Shinohara *et al.*, 1993 ; Okamura & Ibata, 1994). L'application du GRP entraîne des déphasages similaires à ceux provoqués par un créneau de lumière *in vitro* (McArthur *et al.*, 2000) comme *in vivo* (Piggins *et al.*, 1995). Par ailleurs, les neurones à GRP seraient impliqués dans la communication entre les deux compartiments des SCN. En effet, les récepteurs du GRP sont exprimés dans le dmSCN et l'application locale du GRP dans les SCN peut induire dans cette même région l'expression de la protéine c-FOS mais aussi celle de l'ARNm des gènes *Period 1* et *2* (des gènes de l'horloge) (Aida *et al.*, 2002 ; Piggins *et al.*, 2005).

Les neurones contenant la somatostatine (**SOM**) dans les SCN forment un groupe particulièrement délimité et situé entre les neurones VPergiques et VIPergiques (Card *et al.*, 1988 ; Tanaka *et al.*, 1996, Figure 3). Chez le Rat, la protéine SOM présente des variations rythmiques aussi bien en cycle LD qu'en DD (Shinohara *et al.*, 1991 ; Fukuhara *et al.*, 1993). Les neurones à SOM projettent sur les neurones à VIP de la partie ventrolatérale des SCN (Daikoku *et al.*, 1992) et la SOM semble exercer un contrôle inhibiteur sur ces neurones. En effet, la destruction des neurones à SOM chez le Rat aboutit à l'apparition d'une rythmicité

circadienne du VIP dans les SCN (Fukuhara *et al.*, 1994). Les effets de l'application de la SOM sont similaires à ceux provoqués par la lumière, suggérant un rôle joué par ce peptide dans la synchronisation photique de l'horloge (Hamada *et al.*, 1993).

Chez le Rat, les neurones contenant la substance P (SP) sont présents uniquement dans la partie ventrolatérale des SCN (Figure 3), alors que chez le Hamster et la Souris, ces neurones sont plus dispersés dans l'ensemble des SCN (Piggins *et al.*, 2001b ; Abrahamson & Moore, 2001). Le rôle de la SP se traduit par un effet similaire à celui observé après une stimulation lumineuse aussi bien *in vitro* (Shibata *et al.*, 1992a) qu'*in vivo* (Piggins & Rusak, 1997).

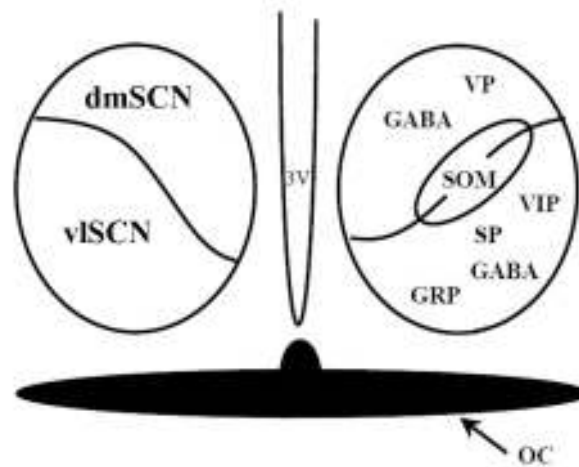


Figure 3 : Régionalisation anatomique et peptidergique des SCN. GABA :  $\gamma$ -Amino Butyric Acid, GRP : Gastrine Releasing Peptide, OC : Chiasma optique, SOM: Somatostatine, SP: Substance P, VIP : Vasoactive Intestinal Polypeptide, VP :Vasopressine, 3V : troisième ventricule.

Enfin, deux neurotransmetteurs sont synthétisés dans les neurones des SCN, l'un est inhibiteur c'est l'acide gamma aminobutyrique (GABA, Moore & Speh, 1993), exprimé dans la majorité des neurones des SCN et l'autre est excitateur, il s'agit du **glutamate** (Hermes *et al.*, 1996 ; Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Il a été montré que ces deux neurotransmetteurs sont mis en jeu dans la régulation de la sécrétion rythmique de mélatonine par la glande pinéale (Perreau-Lenz *et al.*, 2003 ; 2004).

**En résumé, l'organisation des SCN révèle une régionalisation anatomique en deux compartiments ventrolatéral et dorsomédian (Figure 3). Cette régionalisation se retrouve sur le plan fonctionnel et suggère que ces deux parties participent de façon spécifique à la genèse et à la régulation des rythmes circadiens. Les neurones du vlSCN,**

particulièrement à VIP et à GRP, seraient impliqués dans la synchronisation photique, alors que les neurones à VP du dmSCN joueraient un rôle crucial dans l'élaboration et la distribution des signaux circadiens.

## II. Genèse des rythmes circadiens

Le fonctionnement rythmique de l'horloge des SCN est responsable de la rythmicité de nombreuses fonctions physiologiques et comportementales. L'origine de ce fonctionnement est attribuée à un ensemble d'éléments moléculaires, exprimés rythmiquement dans les neurones oscillants des SCN. Cette machinerie moléculaire comporte plusieurs gènes appelés **les gènes de l'horloge** dont les produits, essentiellement des facteurs de transcription, interagissent pour former des boucles de régulation transcriptionnelle positives et négatives. Au sein des neurones des SCN, ces boucles moléculaires sont organisées sur une échelle de 24 h afin de générer une rythmicité circadienne (pour revue voir Ko & Takahashi, 2006).

Nous allons présenter dans cette partie les différents éléments mis en jeu dans la machinerie moléculaire de l'horloge et décrire leur organisation au sein des boucles d'autorégulation positives et négatives.

### 1. Bases moléculaires de la rythmicité

Les différents acteurs moléculaires impliqués dans la genèse des rythmes circadiens sont présentés sur la figure 4. La première boucle de régulation positive implique deux facteurs de transcription : **CLOCK** (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) et **BMAL1** (*Brain and Muscle Arnt Like protein 1*). Ces deux protéines renferment des domaines bHLH-PAS (*Basic Helix Loop Helix-Period Arnt Single Minded*) qui permettent la formation des hétérodimères CLOCK:BMAL1. Cette étape est nécessaire pour la liaison du dimère sur l'ADN qui s'effectue grâce à l'interaction entre le domaine bHLH protéique et la séquence consensus E-box du promoteur. Ainsi, la liaison du dimère CLOCK:BMAL1 sur le promoteur des gènes *Period* (*Per1, Per2, Per3*) et *Cryptochrome* (*Cry1, Cry2*) induit leur expression (Gekakis *et al.*, 1998 ; Kume *et al.*, 1999). Les protéines **PER** et **CRY** forment des dimères grâce à leurs domaines PAS et exercent à leur tour une rétroaction sur le dimère

CLOCK:BMAL1. Cette étape inhibe la transcription des gènes *Per* et *Cry* et constitue une première boucle de régulation négative (Shearman *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'expression du gène *Bmal1* est régulée par l'intermédiaire des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Il s'agit de **ROR** ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et de **REV-ERB** ( $\alpha$  et  $\beta$ ), qui activent les séquences ROREs (*Retinoic acid-related Orphan receptor Response Elements*) présentes sur le promoteur du gène *Bmal1*. Par conséquent, l'action de ces facteurs de transcription constitue deux boucles de régulation supplémentaires, l'une positive et l'autre négative. Ainsi, l'expression du gène *Bmal1* est régulée positivement par ROR et négativement par REV-ERB (Preitner *et al.*, 2002 ; Sato *et al.*, 2004 ; Guillaumond *et al.*, 2005). Le dimère CLOCK:BMAL1 exerce un contrôle positif sur l'expression du gène *Rev-erba* par l'intermédiaire de l'E-box présent au niveau de l'ADN de ce gène (Preitner *et al.*, 2002). Par ailleurs, le contrôle de l'expression des gènes *Ror* par le dimère CLOCK:BMAL1 n'a pas été expérimentalement démontré.

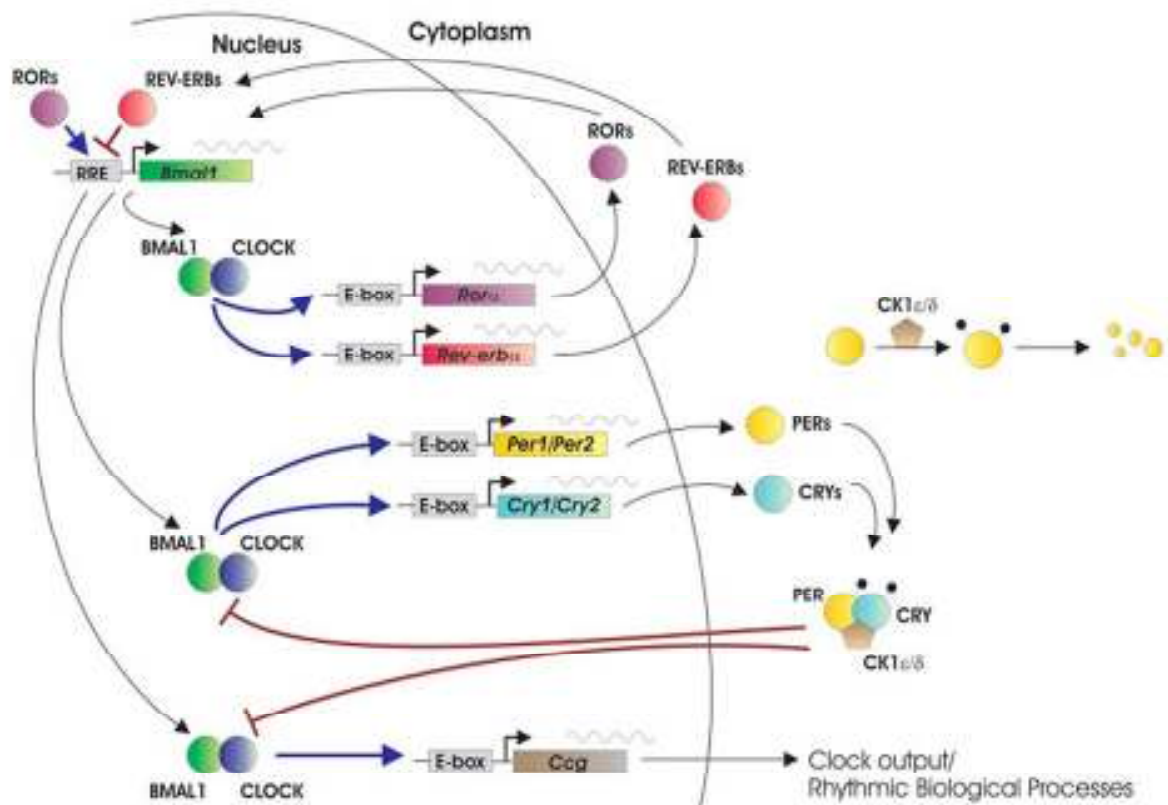


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation des boucles d'autorégulation positives et négatives au sein des SCN. D'après Ko & Takahashi, 2006.

Les éléments Clock et Bmal1 sont essentiels dans la genèse de la rythmicité, en effet, les Souris déficientes pour le gène *Clock* ou *Bmal1*, ont un comportement locomoteur arythmique en obscurité constante (Vitaterna *et al.*, 1994 ; Bunker *et al.*, 2000). Mis à part Clock dont les niveaux d'expression sont constants sur 24 h (Oishi *et al.*, 1998), tous les autres éléments moléculaires des boucles d'autorégulation ont une expression circadienne chez la plupart des rongeurs. Cette rythmicité est retrouvée aussi bien dans l'expression génique (Sun *et al.*, 1997 ; Oishi *et al.*, 1998) que dans les quantités de protéine (Hastings *et al.*, 1999 ; Kume *et al.*, 1999 ; Maywood *et al.*, 2003).

Outre les acteurs directs de ces boucles moléculaires, l'expression d'autres gènes est contrôlée directement par le dimère CLOCK:BMAL1, il s'agit des "gènes de sortie de l'horloge" ou *clock controlled genes* (CCG sur la figure 4). Le gène codant la VP en est un exemple ; en effet, le dimère CLOCK:BMAL1 active sa transcription alors que les éléments PERs de la boucle moléculaire sont capables de réprimer son expression (Jin *et al.*, 1999).

Il est important de noter que l'expression rythmique des gènes de l'horloge n'est pas seulement réservée aux SCN. De nombreuses régions du cerveau, ainsi que des tissus non neuronaux périphériques expriment en effet, ces gènes de façon rythmique (Yamazaki & Takahashi, 2005).

## **2. Genèse des rythmes : le couplage**

*Existe-t-il une corrélation entre la rythmicité des boucles moléculaires et celle de l'activité électrique des neurones suprachiasmatiques ?*

Les neurones des SCN présentent une activité électrique rythmique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Inouye & Kawamura, 1979 ; Green & Gillette, 1982). Également, l'expression des gènes de l'horloge dans les SCN est circadienne. La question se pose de savoir s'il existe un lien entre les oscillations moléculaires des gènes de l'horloge et l'activité électrique rythmique des neurones suprachiasmatiques. Quelques études tendent à mettre en évidence une corrélation entre ces deux paramètres. L'activité électrique rythmique des neurones des SCN *in vitro* peut être bloquée suite à l'application de tétrodontoxine (TTX, un agent bloquant des canaux sodiques) et ce de manière réversible (Shibata & Moore, 1993a ; Welsh *et al.*, 1995). Cette même toxine, appliquée sur des préparations *in vitro*, entraîne une désynchronisation de l'expression rythmique du gène *Per1* dans les SCN (Yamaguchi *et al.*, 2003). Il existerait donc un lien fonctionnel entre l'expression du gène *Per1* et l'activité

électrique des neurones suprachiasmatiques. Cette relation a aussi été démontrée en mesurant simultanément l'expression de *Per1* et l'activité électrique dans les SCN *in vitro*, à l'échelle d'un neurone chez les Souris dont l'expression du gène *Per1* est couplée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*, Quintero *et al.*, 2003). L'utilisation de ce modèle a permis d'établir une corrélation positive entre la décharge rythmique des neurones suprachiasmatiques et la rythmicité de l'expression du gène *Per1*.

Bien qu'elle soit attestée par des éléments expérimentaux, la corrélation entre l'expression des gènes de l'horloge et l'activité électrique des SCN n'est pas clairement acquise. En fait, cette corrélation a été mise en évidence avec un seul gène, celui de *Per1*, et il serait essentiel de confirmer ce lien fonctionnel avec les autres gènes impliqués dans les boucles moléculaires.

*Les SCN peuvent être considérés comme une horloge hétérogène composée de plusieurs milliers de neurones oscillants ; Quels sont les mécanismes impliqués dans le couplage de ces différents oscillateurs ?*

Les enregistrements d'activité électrique des neurones des SCN dissociés en culture ont démontré que 1) les neurones suprachiasmatiques peuvent présenter des activités électriques avec des phases différentes ; 2) il existe une proportion non négligeable de neurones non rythmiques dans les deux subdivisions des SCN (environ 24%, Nakamura *et al.*, 2001). Ces résultats témoignent d'une horloge hétérogène, composée de plusieurs populations neuronales, présentant ou non des oscillations. De ce fait, la présence d'un couplage fonctionnel entre ces différentes populations neuronales semble d'une nécessité majeure.

Les mécanismes mis en jeu dans le couplage ont fait l'objet de plusieurs études. En effet, il existe plusieurs candidats, de nature chimique et/ou électrique, qui seraient impliqués dans ce processus. Le signal GABAergique est considéré parmi les signaux potentiellement impliqués dans le couplage des SCN. Le GABA serait notamment impliqué dans le couplage entre le vlSCN et le dmSCN, puisque l'application d'antagonistes GABAergiques induit un découplage de l'activité électrique entre ces deux subdivisions (Albus *et al.*, 2005). Les Souris déficientes pour le VIP ou pour son récepteur, présentent une désorganisation du rythme d'activité locomotrice (Harmar *et al.*, 2002 ; Colwell *et al.*, 2003) ainsi qu'une arythmie et une désynchronisation de l'activité électrique des neurones des SCN (Aton *et al.*, 2005). La capacité des agonistes VIPergiques à restaurer la synchronisation des neurones des SCN chez ces Souris mutantes, témoigne de l'importance de ce peptide dans le phénomène de couplage.



Outre les signaux neurochimiques, une communication directe entre les neurones des SCN *via* les jonctions GAP peut également être considérée parmi les mécanismes mis en jeu dans le couplage (Long *et al.*, 2005).

### III. Distribution du signal circadien

Une fois construit au sein des SCN, le signal circadien est distribué vers l'ensemble des structures cibles par voie nerveuse, endocrine ou encore par l'intermédiaire de facteurs diffusibles.

Les neurones des SCN envoient des efférences principalement sur des structures hypothalamiques telles que l'aire préoptique médiane (MPOA), le noyau paraventriculaire hypothalamique (PVN), la zone subparaventriculaire (SPZ) et l'hypothalamus dorsomédian (DMH). Dans le thalamus, les projections des SCN atteignent le feuillet intergénéral latéral, et le noyau paraventriculaire thalamique (PVT) (Watts & Swanson, 1987 ; Morin *et al.*, 1994 ; Buijs *et al.*, 1994). Parmi les cibles hypothalamiques, trois catégories de neurones interviennent dans le contrôle de la sécrétion endocrine (pour revue voir Kalsbeek & Buijs, 2002). La première concerne les neurones autonomes des PVN, à l'origine des voies descendantes vers la moelle épinière et plus particulièrement vers les neurones préganglionnaires (sympathiques et parasympathiques). La sécrétion rythmique de **mélatonine** est contrôlée par cette voie. La deuxième catégorie est représentée par les neurones endocrines des PVN synthétisant les neuropeptides hypophysotropes. La dernière catégorie des efférences correspond à des interneurons situés dans le DMH, la SPZ et la MPOA qui interviennent dans l'intégration du message circadien.

Nous allons donc considérer deux sorties rythmiques de l'horloge, l'une endocrine, la sécrétion de corticostérone, et l'autre comportementale, l'activité locomotrice.

#### 1. Sécrétion rythmique des glucocorticoïdes

La sécrétion des glucocorticoïdes est rythmique et sous la dépendance des SCN (Moore & Eichler, 1972). Les concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes sont maximales à la fin de la phase de repos, de manière à anticiper le moment du réveil afin d'assurer les besoins de l'organisme pendant sa phase d'activité. Les neurones à VP des SCN envoient des projections sur les PVN, le premier relais de l'axe hypothalamo-hypophyso-

corticosurrénalien (HPA). Les neurones des PVN sont regroupés selon deux grands types en fonction de la taille de leurs corps cellulaires : les noyaux magnocellulaires, constitués de corps cellulaires sécréteurs de grande taille et les noyaux parvocellulaires dont les corps cellulaires sont de plus petite taille. Les axones des neurones appartenant aux noyaux parvocellulaires rejoignent les capillaires du système porte hypophysaire de l'éminence médiane et y déversent la CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*). La libération de la CRH dans l'hypophyse antérieure induit la synthèse d'ACTH hypophysaire (*Adrenocorticotropic Hormone*) puis sa sécrétion dans la circulation générale. Stimulé par l'ACTH, le cortex surrénalien synthétise et sécrète une famille de stéroïdes dérivés du cholestérol. Ces hormones se répartissent en trois catégories fonctionnelles : les hormones de reproduction, les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Chez l'homme, le glucocorticoïde majoritaire est le cortisol ; la corticostérone, produite en quantité 6 à 8 fois inférieure à celle du cortisol par le cortex surrénalien humain est au contraire le glucocorticoïde le plus abondant chez le Rat et la Souris.

La VP, libérée rythmiquement dans les PVN, exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de corticostérone (Kalsbeek *et al.*, 1992) et contrôle ainsi la rythmicité de cette sécrétion (Figure 5). Le profil journalier de libération de VP présente un pic en milieu de la phase de repos, assurant ainsi un niveau basal de corticostérone dans l'organisme ; pendant la deuxième partie de la phase de repos, la libération de VP commence à décliner permettant ainsi l'augmentation de la sécrétion de corticostérone (Kalsbeek *et al.*, 1996a).

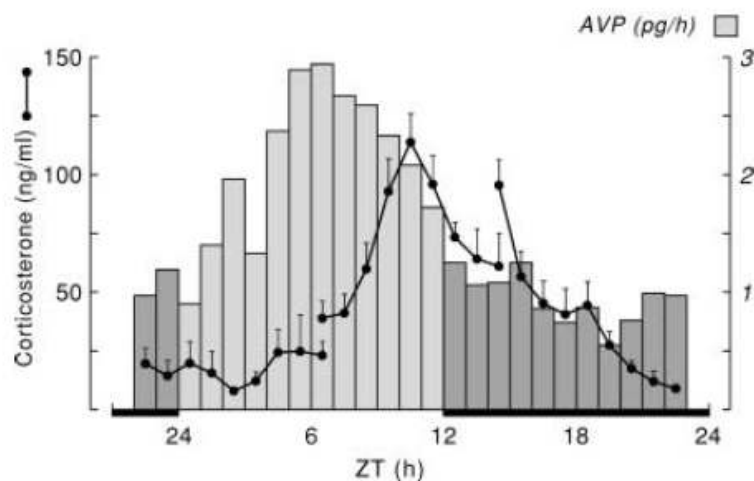


Figure 5 : Relation temporelle entre les profils de variations journalières des concentrations plasmatiques de corticostérone et celles de la vasopressine libérée dans les SCN (AVP).

D'après Kalsbeek & Buijs, 2002.

Outre le signal VPergique inhibiteur, l'augmentation de la sécrétion de corticostérone dépend d'un signal stimulateur, dont la nature est inconnue ; il s'agirait probablement d'un neurotransmetteur excitateur libéré par les SCN (Kalsbeek *et al.*, 1996b). Le signal VPergique parviendrait aux PVN indirectement *via* le DMH qui reçoit une afférence issue des SCN et envoie des projections sur les PVN par des neurones GABAergiques (Roland & Sawchenko, 1993). L'existence de cette voie indirecte a été confirmée par des études électrophysiologiques (Hermes *et al.*, 2000).

La sécrétion d'ACTH est rythmique mais son amplitude est faible, ne reflétant pas celle de la corticostérone, beaucoup plus importante. Il a donc été suggéré que la mise en place du pic nocturne de corticostérone serait essentiellement due à une augmentation de la sensibilité surrénalienne *vis-à-vis* de l'ACTH (Kaneko *et al.*, 1981). Cette sensibilité est contrôlée par l'intermédiaire d'une voie nerveuse sympathique issue des SCN *via* les PVN et la moelle épinière jusqu'aux glandes surrénales (Buijs *et al.*, 1999). C'est le nerf splanchnique qui innerve la médullosurrénale et module la stéroïdogénèse *via* 1) une induction de la synthèse locale d'ACTH qui va s'ajouter à l'ACTH provenant de la circulation générale et 2) une augmentation de la libération des catécholamines, connues pour induire la synthèse des glucocorticoïdes. Par ailleurs, la dénervation des glandes surrénales entraîne une augmentation de l'activité surrénalienne pendant la phase de repos supprimant ainsi la variation journalière de sécrétion de corticostérone (Jasper & Engeland, 1994).

## 2. L'activité locomotrice : une sortie comportementale

L'organisation rythmique de l'activité locomotrice est complètement abolie après une lésion bilatérale des SCN (Figure 6 ; Stephan & Zucker, 1972 ; Wollnik & Turek, 1989).

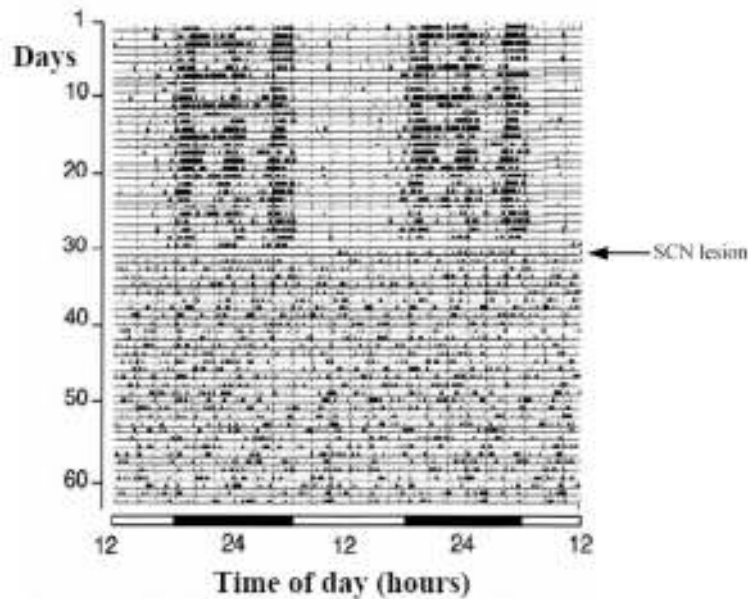


Figure 6 : Le rythme d'activité locomotrice est complètement aboli après une lésion des SCN chez le Rat. D'après Wollnik & Turek, 1989.

La question des modalités du contrôle de la rythmicité de l'activité locomotrice par les SCN reste actuellement ouverte. Il a été suggéré que certaines efférences des SCN seraient impliquées dans la distribution du message rythmique vers les centres responsables de la locomotion. En effet, la lésion de la SPZ et plus particulièrement de sa région ventrale, induit une diminution de l'amplitude de l'activité locomotrice (Lu *et al.*, 2001b). D'autre part, la lésion du DMH provoque une désorganisation de la rythmicité de l'activité locomotrice (Chou *et al.*, 2003). Ainsi, la voie SCN→SPZ→DMH pourrait intervenir dans la distribution du message rythmique contrôlant l'organisation journalière de l'activité locomotrice (Saper *et al.*, 2005a). Par ailleurs, la rythmicité de l'activité locomotrice peut être restaurée chez les animaux ayant subi une lésion des SCN suivie d'une greffe contenant des cellules de SCN encapsulées de manière à empêcher la formation de nouvelles connexions nerveuses (Silver *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent l'implication de facteur(s) diffusible(s) sécrété(s) par les

SCN afin de contrôler la rythmicité du comportement locomoteur. L'ensemble des résultats obtenus dans ce domaine permet de proposer trois molécules qui pourraient assurer la distribution du message responsable de la rythmicité de l'activité locomotrice : **la PK2 (Prokineticin-2)**, **le TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ )** et **la CLC (Cardiotrophin-like Cytokine)**.

Dans les SCN, le profil d'expression de l'ARNm **de la PK2** est circadien et caractérisé par un pic en début de jour subjectif, et des niveaux d'expression très bas pendant la phase d'activité (Cheng *et al.*, 2002). L'implication de la PK2 dans le contrôle du comportement locomoteur se traduit par sa capacité à bloquer de manière réversible l'activité locomotrice nocturne chez le Rat (Cheng *et al.*, 2002). Le gène de la PK2 est un gène de sortie de l'horloge ; il présente des motifs E-box dans son promoteur (Cheng *et al.*, 2002) et son expression devient arythmique chez les Souris déficientes pour les gènes *cry1* et *cry2* (Cheng *et al.*, 2005). Chez des Souris dépourvues de PK2, la rythmicité de l'activité locomotrice est maintenue mais à une amplitude plus faible que celle des Souris sauvages (Li *et al.*, 2006), suggérant que ce facteur ne soit pas le seul à intervenir dans le contrôle de la rythmicité du comportement locomoteur. L'organisation de l'activité locomotrice nocturne des Souris mutantes révèle une dominance de la composante locomotrice située à la transition nuit/jour, lorsque l'expression de la PK2 est maximale chez les Souris sauvages. Ainsi, l'effet inhibiteur de la PK2 aurait lieu pendant une fenêtre de sensibilité située au début de la période de repos.

L'ARNm **du TGF $\alpha$**  est exprimé de façon rythmique dans les SCN chez le Hamster (Kramer *et al.*, 2001) et la Souris (Tournier *et al.*, 2007) et ces niveaux d'expression sont faibles pendant la période d'activité. Comme la PK2, le TGF $\alpha$  possède un effet inhibiteur sur l'activité locomotrice, l'injection de ce facteur dans le troisième ventricule entraîne une suppression réversible de l'activité locomotrice ainsi qu'une désorganisation du cycle veille-sommeil (Kramer *et al.*, 2001). Le TGF $\alpha$  agit sur des récepteurs à EGF (*Epidermal Growth Factor*) présents dans les SCN et dans la SPZ (Hao & Schwaber, 2006). Les Souris dépourvues de récepteurs à EGF présentent une modeste augmentation (14 %) de la composante locomotrice diurne, permettant de suggérer que le TGF $\alpha$  ne soit pas l'unique sortie contrôlant le rythme d'activité locomotrice.

Récemment, une étude réalisée par Kraves & Weitz (2006) a mis en évidence l'implication de **la CLC**, une molécule appartenant à la famille des cytokines, dans le contrôle de la rythmicité de l'activité locomotrice. Cette cytokine est exprimée dans les neurones à VP

de la partie *Core* des SCN de manière rythmique avec un pic en fin de jour subjectif. L'injection de CLC dans le troisième ventricule inhibe de manière transitoire l'activité locomotrice et le blocage des récepteurs de la CLC, se trouvant dans la zone périventriculaire, induit, en fin de jour subjectif, une augmentation de l'activité locomotrice. La fenêtre d'action de ce facteur est donc localisée en fin de jour subjectif. Le gène de la CLC est un gène de sortie de l'horloge ; son expression est régulée positivement par le dimère CLOCK:BMAL1, alors que PER1 exerce un contrôle négatif sur cette expression.

**En résumé, la régulation de l'organisation rythmique de l'activité locomotrice fait intervenir des voies nerveuses efférentes des SCN mais aussi des facteurs sécrétés directement par ces noyaux. L'action de la CLC et la PK2 s'effectueraient respectivement au début et à la fin de la période de repos, celle du TGF $\alpha$  assurerait une inhibition de l'activité locomotrice pendant l'ensemble de cette période (Kraves & Weitz, 2006 ; Li *et al.*, 2006). L'action du TGF $\alpha$  sur ses récepteurs dans la SPZ, pourrait constituer un lien éventuel entre l'activation des voies neuronales et l'effet des facteurs diffusibles.**

## **B. Remise à l'heure de l'horloge circadienne**

Les organismes ne vivent pas en conditions constantes et sont au contraire soumis à toutes les variations nycthémérales de leur environnement. L'alternance lumière-obscurité, la disponibilité alimentaire, les menaces des prédateurs, les variations de température et de luminosité ainsi que l'environnement socio-écologique représentent les nombreux facteurs qui influencent la période des rythmes biologiques des organismes. Pour leur survie, les organismes doivent présenter un fonctionnement synchrone avec les variations de leur milieu. La synchronisation est le mécanisme par lequel la période d'un rythme biologique peut être modifiée pour devenir égale à celle de la rotation de la terre sur elle-même. Le synchroniseur ou *Zeitgeber* (donneur de temps) est le facteur environnemental dont la variation cyclique est capable d'asservir un rythme biologique dans la mesure où il impose à ce dernier sa propre période.

L'alternance lumière-obscurité est un synchroniseur puissant des rythmes circadiens, néanmoins, d'autres signaux, appelés 'non photiques' par opposition à la lumière, peuvent également influencer et ajuster la périodicité de ces rythmes. Une courbe de réponse de phase correspond à la mesure de la réponse de l'organisme suite à la présentation d'un stimulus potentiellement capable d'entraîner des déphasages temporels. En fonction de la nature des stimuli et du moment auquel ils sont présentés, on peut mesurer soit des avances soit des retards de phase.

Les signaux synchroniseurs, photiques et non-photiques, parviennent aux SCN par l'intermédiaire de voies nerveuses afférentes. Avant de nous intéresser aux mécanismes de l'entraînement des rythmes biologiques, une description anatomique et neurochimique de ces voies afférentes paraît essentielle.

## I. Organisation des principales afférences des SCN

Les afférences majeures des SCN sont organisées en trois voies : une première issue directement de la rétine, une deuxième d'origine thalamique et une troisième voie provenant des noyaux du Raphé mésencéphaliques (Figure 7).

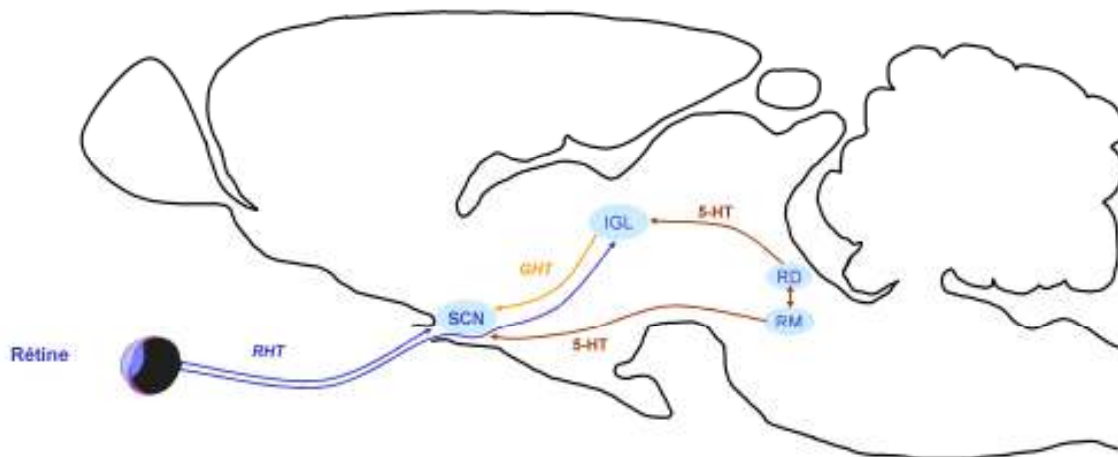


Figure 7 : Principales afférences des noyaux suprachiasmatiques (SCN) présentées sur un schéma de coupe sagittale d'un cerveau de rongeur. GHT : Tractus géniculohypothalamique, IGL : Feuilles intergéniculés latéraux du thalamus, RHT : tractus rétinohypothalamique. Les voies sérotoninergiques issues des noyaux du Raphé dorsal et médian (RD et RM) sont présentées en rouge.

### 1. Les afférences rétinienne

L'entraînement des rythmes biologiques par la lumière nécessite l'intégrité de la rétine comme ont pu le montrer les expériences d'énucléation (Foster *et al.*, 1993). La rétine projette directement sur la partie ventrolatérale des SCN, par l'intermédiaire du tractus rétinohypothalamique (*Retinohypothalamic tract*, **RHT**, Figure 7, Moore & Lenn, 1972 ; Johnson *et al.*, 1988b) et les fibres rétinienne établissent des synapses principalement sur les neurones contenant le VIP et le GRP (Tanaka *et al.*, 1993 ; 1997). Des lésions sélectives des fibres du RHT projetant sur les SCN provoquent une perte de l'entraînement des fonctions circadiennes sans pour autant de perte de vision (Johnson *et al.*, 1988a), ce phénomène est appelé "aveuglement circadien". Ce tractus RHT est issu d'une faible proportion (0.1 %) de



l'ensemble des cellules ganglionnaires de la rétine interne (Moore *et al.*, 1995 ; Provencio *et al.*, 1998). Des projections rétiniennes faisant partie du RHT innervent également des structures thalamiques telles que les feuillets intergénéculés latéraux (Pickard, 1985) ou encore le prétectum (Mikkelsen & Vrang, 1994).

Les réponses observées lors de la synchronisation des SCN par la lumière étaient attribuées soit individuellement aux cônes ou aux bâtonnets, soit aux deux ensembles. Cependant, les Souris obtenues par mutagenèse et dont la rétine est dépourvue de cônes et de bâtonnets sont tout de même synchronisées par le cycle LD (Foster *et al.*, 1991 ; Freedman *et al.*, 1999), suggérant que les photorécepteurs ne sont pas essentiels dans le processus d'entraînement photique. Par la suite, des études ont mis en évidence la présence d'un photopigment appartenant à la famille des opsines, **la mélanopsine** (Provencio *et al.*, 2002) dans les cellules ganglionnaires à l'origine du RHT (Berson *et al.*, 2002). Ces cellules à mélanopsine envoient des projections sur les SCN mais aussi sur les feuillets intergénéculés latéraux thalamiques (Hattar *et al.*, 2006). Les cellules ganglionnaires contenant ce photopigment sont intrinsèquement photosensibles et présentent un pic de sensibilité aux alentours de 484 nm, ce qui correspond bien au spectre d'action de l'entraînement photique chez les rongeurs (Berson *et al.*, 2002). Les Souris déficientes pour le gène codant la mélanopsine montrent une atténuation de la réponse à une stimulation lumineuse mais restent néanmoins synchronisées par le cycle LD (Panda *et al.*, 2002). Ce photopigment n'est donc pas le seul acteur responsable de l'entraînement photique. Les photorécepteurs de la rétine externe pourraient également intervenir dans ce processus. En effet, les Souris dépourvues de cônes, de bâtonnets et de mélanopsine ne sont plus synchronisées par le cycle LD (Hattar *et al.*, 2003 ; Panda *et al.*, 2003). Il est donc actuellement admis que ces trois éléments sont indispensables à l'entraînement par la lumière des rythmes biologiques (Hattar *et al.*, 2003). Il est important de noter que le RHT renferme une proportion de cellules ganglionnaires (10-20 %) n'exprimant pas la mélanopsine (Sollars *et al.*, 2003).

Le glutamate (**GLU**) est le neurotransmetteur principal du RHT (pour revue voir Ebling, 1996). En effet, van den Pol (1991) a pu mettre en évidence par microscopie électronique la présence de terminaisons pré-synaptiques contenant le GLU au sein des SCN, et deux ans plus tard, De Vries (1993) a démontré que ces terminaisons proviennent de la rétine. Le RHT renferme également le neuropeptide **PACAP** (*Pituitary Adenylate Cyclase-*

*Activating Polypeptide*) qui est co-localisé avec le GLU dans les terminaisons rétinienne des SCN (Hannibal *et al.*, 1998 ; 2000). Ce peptide est d'ailleurs co-exprimé avec la mélanopsine dans les cellules ganglionnaires qui sont à l'origine du RHT (Hannibal *et al.*, 2002).

## 2. Les afférences thalamiques

La région ventrolatérale des SCN reçoit une importante innervation en provenance des feuillets intergénéculés latéraux du thalamus (IGL pour *Intergeniculate Leaflets*) via le tractus géniculohypothalamique (*Geniculohypothalamic tract*, **GHT**, Figure 7, Swanson *et al.*, 1974 ; Card & Moore, 1989). Les IGL (Figure 8) appartiennent au complexe géniculé latéral du thalamus et forment un feuillet transversal intercalé entre le noyau géniculé dorso-latéral (DLG) et le noyau géniculé ventro-latéral (VLG, Hickey & Spear, 1976).

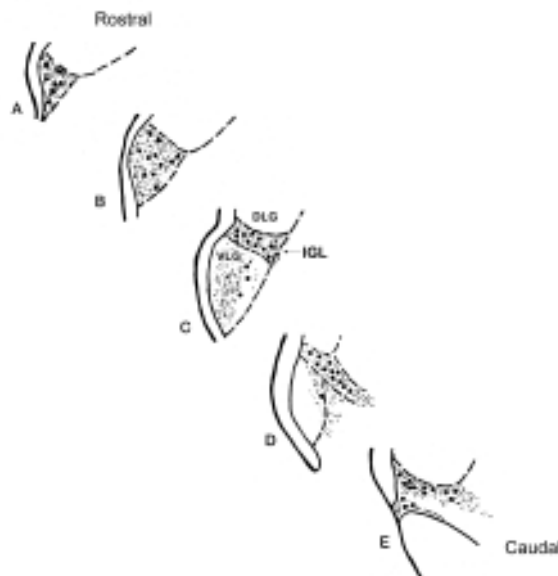


Figure 8 : Représentation schématique des IGL en fonction de l'axe rostrocaudal du cerveau. Les points noirs illustrent le marquage des neurones exprimant le neuropeptide Y.

D'après Morin *et al.*, 1992.

Les IGL reçoivent une projection rétinienne directe et bilatérale (pour revue, voir Harrington, 1997). Chez le Hamster, certaines cellules ganglionnaires qui envoient des projections sur les SCN émettent des collatérales innervant les IGL (Pickard, 1985). Ces cellules ganglionnaires appartiennent à une population différente de celles qui projettent uniquement sur les SCN ou sur les IGL. Chez le Rat, chaque IGL renferme approximativement 1500 neurones qui sont majoritairement **GABAergiques** (Moore & Speh, 1993). Ces neurones sont séparés en deux populations en fonction de la nature chimique du neuromédiateur colocalisé avec le GABA: un tiers de cette population contient le Neuropeptide Y (**NPY**), le reste est de nature met-Enképhalinergique (**mENK**). Les quantités du NPY dans les SCN évoluent en fonction du nyctémère, en suivant un profil bimodal caractérisé par deux pics aux transitions jour/nuit et nuit/jour. En obscurité constante, un seul pic persiste : il s'agit de celui correspondant à la transition jour/nuit (Shinohara *et al.*, 1993).

L'organisation des afférences des IGL montre que chaque feuillet envoie des projections sur chaque SCN. Il existerait cependant une dominance ipsilatérale de ces projections (Card & Moore, 1989). Par ailleurs, les fibres mENKergiques sont impliquées dans la connexion entre les deux IGL. Chez le Hamster syrien et contrairement au Rat, ces neurones mENKergiques envoient des projections sur les SCN (Morin & Blanchard, 1995). Au sein du vlSCN, les fibres NPYergiques et GABAergiques sont au contact des neurones contenant le VIP (Hisano *et al.*, 1988 ; Ibata *et al.*, 1988 ; François-Bellan & Bosler, 1992). Une telle organisation reflète une interaction fonctionnelle entre les afférences thalamiques et rétiniennes. Finalement, des études de traçage de voie ont démontré que les IGL sont innervés par les SCN, cependant, la nature neurochimique et le rôle de cette voie de projection demeurent inconnus (Card & Moore, 1989).

Les IGL constituent une structure clé du système circadien, puisqu'ils transmettent aux SCN à la fois des informations photiques et non photiques. Il a été proposé que les IGL intègrent les informations photiques et non photiques permettant ainsi de moduler le message distribué à partir des SCN vers les structures et les organes cibles (Moore & Card, 1994 ; Mrosovsky, 1995 ; Moore, 1996). Un rôle des IGL dans la transmission des informations photiques a pu être mis en évidence. En effet, chez le Hamster, une lésion des IGL réduit les avances de phase induites par une stimulation lumineuse en fin de nuit subjective (Harrington & Rusak, 1986; Pickard *et al.*, 1987). De plus, les IGL jouent un rôle important dans

l'entraînement de l'activité locomotrice par une photopériode squelettique qui consiste en l'application de 2 créneaux de lumière de 1 heure espacés de 12 heures. Les Hamsters ayant subi une lésion bilatérale des IGL ne sont plus synchronisés à cette photopériode et présentent une activité de libre cours (Edelstein & Amir, 1999). Par ailleurs, les IGL sont impliqués dans l'entraînement non photique des rythmes biologiques. C'est ainsi qu'une lésion des IGL inhibe les décalages de phase de type non photique induits par des injections de benzodiazépines (Johnson *et al.*, 1988c ; Biello *et al.*, 1991) ou d'agonistes sérotoninergiques chez le Hamster (Schuhler *et al.*, 1999). Les décalages de phase provoqués par un régime hypocalorique ou par l'activité locomotrice induite par la présence d'une nouvelle roue dans la cage sont eux aussi bloqués par une lésion des IGL (Janik & Mrosovsky, 1994 ; Wickland & Turek, 1994 ; Challet *et al.*, 1996).

### 3. Organisation des afférences sérotoninergiques

Les afférences sérotoninergiques au système circadien sont schématisées sur la figure 9. C'est le noyau du Raphé médian qui est la source principale des projections sérotoninergiques vers les SCN (Azmitia & Segal, 1978 ; Hay-Schmidt *et al.*, 2003). Une deuxième voie, elle aussi majeure pour le système circadien, provient du Raphé dorsal et arrive aux IGL (Azmitia & Segal, 1978 ; Meyer-Bernstein & Morin, 1996 ; Vrang *et al.*, 2003). Des études de traçage de voies rétrograde et antérograde ont démontré l'implication des groupes latéraux du Raphé dorsal dans la projection vers les IGL (Pasquier & Villar, 1982 ; Villar *et al.*, 1988).

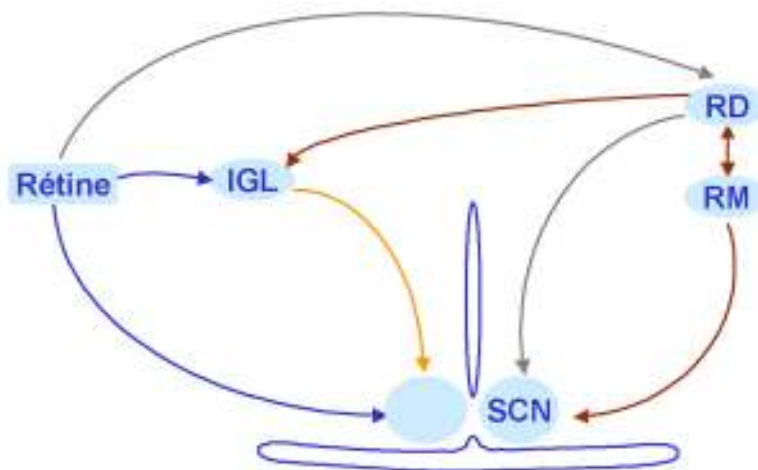


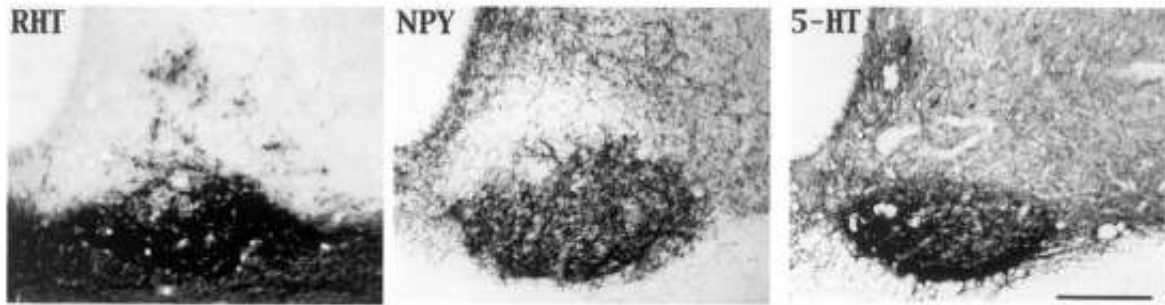
Figure 9 : Organisation des afférences sérotoninergiques au système circadien. Les voies représentées en gris ont été mises en évidence chez le Rat. IGL : Feuilletts intergénéculés latéraux du thalamus, RD : Raphé dorsal, RM : Raphé médian.

L'existence d'une voie de projection directe entre le Raphé dorsal et les SCN a fait l'objet de nombreuses études et reste controversée. En effet, Vertes (1991) n'est pas parvenu à visualiser un marquage dans les SCN suite à une injection du traceur antérograde dans la partie ventrale du Raphé dorsal. D'autre part, Kawano et collaborateurs (1996) et Moga et Moore (1997) ont décrit chez le Rat une voie de communication directe mais de faible densité entre ces deux structures. Cette voie serait issue principalement des groupes latéraux du Raphé dorsal (Moga & Moore, 1997). Chez le Rat, ces groupes latéraux du Raphé dorsal

reçoivent une innervation provenant des cellules ganglionnaires de la rétine (Shen & Semba, 1994 ; Fite *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent la présence, chez le Rat, d'une voie de projection issue de la rétine *via* le Raphé dorsal-latéral innervant les SCN et les IGL ; une telle voie n'a cependant pas été décrite chez le Hamster. Le Raphé médian envoie des projections sur le Raphé dorsal avec une densité importante au niveau des groupes latéraux de ce dernier noyau (Kalen *et al.*, 1988 ; Vertes *et al.*, 1999). À son tour, le Raphé dorsal envoie une projection dense vers le Raphé médian (Behzadi *et al.*, 1990 ; Vertes & Kocsis, 1994). L'existence d'une telle connexion réciproque pourrait refléter des interactions fonctionnelles entre ces deux noyaux, visant à moduler le fonctionnement des neurones sérotoninergiques. Par exemple, la stimulation électrique du Raphé médian ou dorsal chez le Hamster, induit la libération de 5-HT (Dudley *et al.*, 1999) et l'expression de c-Fos dans les SCN ainsi que des déphasages du rythme d'activité locomotrice (Meyer-Bernstein & Morin, 1999).

Si la voie de projection Raphé→SCN est très dense, elle n'est pourtant pas exclusivement sérotoninergique (Meyer-Bernstein & Morin, 1996 ; Hay-Schmidt *et al.*, 2003). La nature du neurotransmetteur présent dans les afférences non sérotoninergiques est encore inconnue. De plus, l'innervation sérotoninergique des SCN ne serait issue que d'une faible proportion de neurones sérotoninergiques du Raphé médian (Hay-Schmidt *et al.*, 2003) suggérant l'existence de nombreuses collatérales. L'organisation morphologique des terminaisons sérotoninergiques dans les SCN montre qu'elles sont au contact des terminaisons NPYergiques (Guy *et al.*, 1987) et GABAergiques (Bosler, 1989). De plus, les afférences GABAergiques et sérotoninergiques convergent dans le vlSCN, et particulièrement sur les neurones VIPergiques (Bosler & Baudet, 1985 ; François-Bellan & Bosler, 1992). Cette organisation suggère une interaction fonctionnelle entre ces différentes afférences pour moduler *in fine* la synchronisation et le fonctionnement de l'horloge circadienne.

Les projections sérotoninergiques participent à l'intégration des informations non photiques et modulent la synchronisation photique des rythmes biologiques (voir § B-III-1 et 2). Les injections de 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) dans le Raphé médian induisent une destruction complète de la voie sérotoninergique innervant les SCN et entraînent un rallongement de la phase d'activité nocturne (Smale *et al.*, 1990), une augmentation de la période endogène en condition de lumière constante (Meyer-Bernstein & Morin, 1996) ou encore une suppression des décalages de phase induits par le triazolam, une benzodiazépine (Cutrera *et al.*, 1994a).



---

*Figure 10 : Les afférences principales des SCN du Rat. Les projections rétiniennes (RHT) sont visualisées suite à l'injection d'un marqueur antérograde dans la rétine. L'immunodétection du NPY et de la 5-HT révèle les projections des IGL et du Raphé médian, respectivement. Barre d'échelle=100  $\mu$ m. D'après Moore et al., 2002.*

**Le RHT, le GHT et les projections sérotoninergiques du Raphé sont les trois afférences majeures de l'horloge circadienne. Ces trois voies innervent la région ventrolatérale des SCN (Figure 10) et sont impliquées dans les processus de synchronisation photique et non photique que nous allons détailler dans la partie suivante.**

## II. Entraînement de l'horloge circadienne

### 1. La lumière

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la rétine, entrée sensorielle du système circadien, est un élément essentiel dans l'entraînement des rythmes biologiques par la lumière. Des créneaux lumineux présentés à des animaux en obscurité constante peuvent entraîner des déphasages des rythmes circadiens. Appliqué en début de nuit subjective, un créneau lumineux engendre un retard de phase, alors qu'une avance de phase est observée lorsque ce créneau est présenté en fin de nuit subjective (Figure 11). Pendant le jour subjectif, les créneaux de lumière n'ont aucun effet sur la phase des fonctions rythmiques.

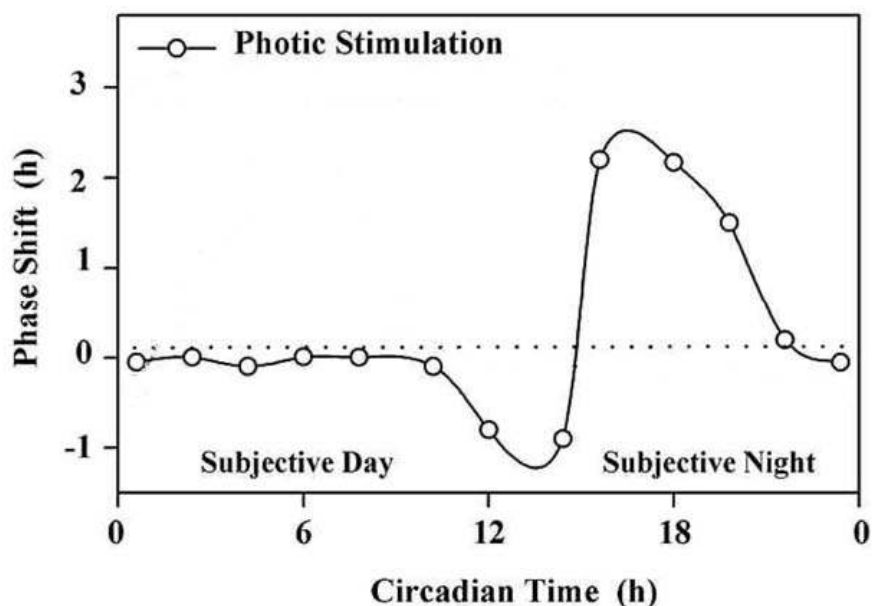


Figure 11 : Une courbe de réponse de phase illustrant les déphasages du rythme d'activité locomotrice induits par la lumière pendant un cycle de 24 h chez le Hamster syrien. Une stimulation lumineuse entraîne un retard ou une avance de phase, respectivement au début et à la fin de la nuit subjective. Modifié d'après Challet & Pévet, 2003.



La présence d'un stimulus lumineux induit la libération de plusieurs neurotransmetteurs des terminaisons du RHT dans les SCN. Le GLU est le neurotransmetteur principal impliqué dans les réponses photiques (pour revue voir Ebling, 1996). Le GLU libéré dans les SCN se fixe sur les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) dont le blocage empêche des déphasages du rythme d'activité locomotrice induits par la lumière (Colwell *et al.*, 1990 ; 1991). L'application du NMDA entraîne des décalages de phase de l'activité électrique des neurones des SCN (Shibata *et al.*, 1994) et du rythme d'activité locomotrice (Mintz *et al.*, 1999) qui sont similaires à ceux obtenus à la suite d'un créneau lumineux. Les mêmes effets sont constatés suite à l'application du peptide PACAP *in vitro* (Harrington *et al.*, 1999) mais aussi *in vivo* (Piggins *et al.*, 2001a). Outre ce rôle, le PACAP serait impliqué dans le contrôle de l'amplitude des déphasages induits par le GLU (Chen *et al.*, 1999).

Les éléments moléculaires impliqués dans la genèse de la rythmicité sont également modifiés lors de l'entraînement photique. En effet, une stimulation lumineuse appliquée pendant la nuit subjective induit une expression accrue des gènes *Per1* et *Per2* dans les SCN (Albrecht *et al.*, 1997 ; Shigeyoshi *et al.*, 1997 ; Takumi *et al.*, 1998 ; Dardente *et al.*, 2002). L'induction de *Per2* n'est possible qu'en début de nuit subjective alors que celle de *Per1* est observée aussi bien en début qu'en fin de nuit subjective. L'induction des gènes de l'horloge serait à l'origine des déphasages comportementaux observés suite aux créneaux lumineux. La perturbation des déphasages induits par la lumière observée chez les Souris déficientes pour les gènes *Per1* et *Per2*, renforce cette éventualité (Albrecht *et al.*, 2001). Il est important de noter que le GLU est capable d'induire *in vitro* l'expression des gènes *Per1* et *Per2* pendant la nuit subjective (Neilsen *et al.*, 2001). Ceci vient s'ajouter aux nombreuses données expérimentales permettant de confirmer l'implication de ce neurotransmetteur dans l'entraînement photique.

Les neurotransmetteurs du GHT peuvent moduler la synchronisation photique des rythmes biologiques. Les déphasages induits par les créneaux lumineux pendant la nuit subjective sont bloqués suite à l'application locale du NPY alors qu'une induction est observée lorsqu'un antisérum anti-NPY est administré (Biello, 1995 ; Yannielli & Harrington, 2001). L'application du NPY empêche les déphasages d'activité électrique des neurones des SCN induits par le GLU (Biello *et al.*, 1997) et entraîne une forte inhibition de l'expression des gènes *Per1* et *Per2* induite par la lumière (Brewer *et al.*, 2002).

Le GABA peut également interagir avec le signal photique pour moduler les processus d'entraînement par la lumière. L'application d'agonistes GABAergiques atténue les déphasages d'activité électrique des neurones des SCN et l'expression de c-Fos, induits par des créneaux lumineux (Gillespie *et al.*, 1999 ; Lall & Biello, 2003). L'action du GABA s'effectuerait *via* une réduction de la libération du GLU des terminaisons du RHT (Jiang *et al.*, 1995). Du fait de la présence en abondance des neurones GABAergiques dans les SCN, l'action du GABA sur la synchronisation photique proviendrait non seulement des afférences thalamiques mais aussi des SCN eux mêmes.

## 2. Les signaux non-photiques

Outre l'alternance jour/nuit qui constitue le synchroniseur le plus puissant de l'horloge, d'autres signaux peuvent influencer la période des rythmes et entraîner des décalages de phase sur le plan moléculaire, électrique et comportemental. La nature des facteurs non photiques est très diversifiée (activation comportementale, substances pharmacologiques ou encore facteurs métaboliques) mais ils sont tous capables de provoquer des décalages de phase relativement semblables. Ces signaux non photiques exercent leur effet essentiellement pendant le jour subjectif où ils entraînent une avance de phase. Appliqués en milieu de nuit subjective et selon leur nature, ces signaux peuvent induire un retard de phase de faible amplitude (Figure 12).

L'activation comportementale pendant la phase de repos est l'un des facteurs non photiques le mieux étudié chez les rongeurs de laboratoire. La procédure la plus classique est de mettre à disposition des animaux placés en DD, une nouvelle roue dans leur cage. Les animaux se mettent alors à courir (activité locomotrice induite par la nouveauté), provoquant le jour suivant une avance de phase importante pendant le jour subjectif ainsi qu'un retard de phase de faible amplitude pendant la nuit subjective (Reebs & Mrosovsky, 1989). Une autre modalité non photique est une privation de sommeil pour 3 h pendant la phase de repos des animaux, qui entraîne des avances de phase de l'activité locomotrice le jour suivant (Antle & Mistleberger, 2000). L'éveil forcé pendant la phase de repos naturel peut ainsi influencer la période des rythmes et pourrait être à l'origine des déphasages induits par la présence d'une roue. Ceci expliquerait la faible amplitude des déphasages provoqués par la roue durant la nuit

subjective, période d'activité des rongeurs nocturnes. L'administration de certaines substances pharmacologiques telles que le triazolam (Cutrera *et al.*, 1994b), la morphine (Marchant & Mistlberger, 1995) ou encore la mélatonine (Pitrosky *et al.*, 1999) peut également entraîner des décalages de phase non photiques du rythme d'activité locomotrice. Enfin, des facteurs métaboliques, tels que la restriction calorique sont capables de synchroniser les rythmes circadiens chez le Rat (Challet *et al.*, 1997b).

De nombreuses données expérimentales ont illustré l'implication des afférences thalamiques des SCN dans la synchronisation non photique. À l'origine de ces afférences, les IGL sont considérés comme un site d'intégration des signaux non photiques comme nous l'avons vu précédemment. Le NPY transmet essentiellement aux SCN des informations non photiques. L'effet du NPY sur l'activité électrique des SCN *in vitro* se manifeste par une avance de phase pendant le jour subjectif ainsi qu'un léger retard de phase en milieu de nuit subjective (Figure 12, Shibata & Moore, 1993b). L'application locale du NPY par microinjection dans les SCN *in vivo* engendre des déphasages non photiques de l'activité locomotrice, et ces déphasages sont bloqués après l'injection d'un antisérum anti-NPY (Biello *et al.*, 1994 ; Huhman & Albers, 1994). Ainsi, les IGL interviennent dans l'intégration des signaux non photiques, qui sont ensuite acheminés vers les SCN *via* leurs projections NPYergiques.

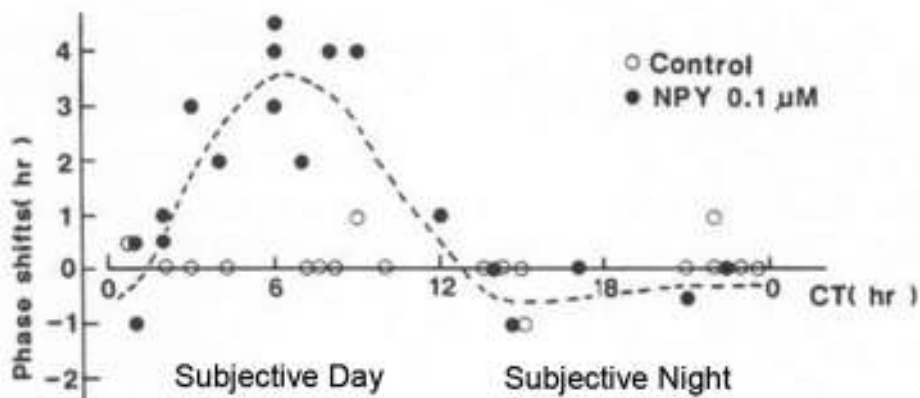


Figure 12 : Déphasages de l'activité électrique des neurones suprachiasmatiques enregistrés *in vitro* suite à l'application du NPY. Modifié d'après Shibata & Moore, 1993b.

Sur le plan moléculaire, les stimuli non photiques entraînent des modifications de l'expression des gènes de l'horloge dans les SCN. Les déphasages comportementaux survenant pendant le jour subjectif sont corrélés avec une suppression de l'expression de *Per1* et de *Per2* dans les SCN alors qu'une induction de *Per2* est observée en fin de nuit subjective (Maywood *et al.*, 1999 ; Caldelas *et al.*, 2005). Des effets similaires sur l'expression des gènes *Per* dans les SCN ont été rapportés suite à l'application du NPY sur des tranches hypothalamiques (Fukuhara *et al.*, 2001) ainsi qu'*in vivo*, après une microinjection locale de ce peptide dans les SCN (Maywood *et al.*, 2002).

**En résumé, les SCN reçoivent de nombreuses afférences véhiculant des informations photiques et non photiques, qui assurent la synchronisation et le fonctionnement de cette horloge en phase avec les variations de l'environnement. La lumière est le Zeitgeber le plus puissant, ses effets sont transmis directement par l'intermédiaire du RHT. L'implication des IGL et du GHT permet également l'intégration des signaux photiques et non photiques et leur transmission aux SCN. Dans l'environnement naturel, les deux types de signaux coexistent, interagissent et modifient réciproquement leur action.**

### **III. Rôle de la 5-HT dans l'entraînement des rythmes circadiens**

Les afférences sérotoninergiques jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes de synchronisation photique et non photique de l'horloge circadienne. L'implication de ces afférences a été étudiée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* chez plusieurs espèces de rongeurs de laboratoire (Rat, Souris, Hamster).

#### **1. Modulation de l'information photique**

La 5-HT joue un rôle modulateur dans l'entraînement des fonctions circadiennes par la lumière, ceci se traduit par une atténuation des réponses comportementales, cellulaires, et moléculaires observées à la suite d'une stimulation lumineuse.

L'induction de la protéine c-FOS dans les SCN par la lumière peut être atténuée après une stimulation électrique des neurones du Raphé (Meyer-Bernstein & Morin, 1999) ou après une injection systémique de la 8-OH-DPAT, un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A/7</sub> (Rat : Recio

*et al.*, 1996, Hamster : Glass *et al.*, 1994). Cependant, cette diminution de l'expression de c-FOS dans les SCN du Rat est plus faible laissant présager une implication moindre de la 5-HT dans la synchronisation photique chez cette espèce. Parallèlement, une injection systémique de la 8-OH-DPAT chez le Hamster syrien empêche les déphasages du rythme d'activité locomotrice induits par un flash de lumière aussi bien au début qu'à la fin de nuit subjective (Figure 13, Rea *et al.*, 1994). *In vitro*, sur des préparations de tranches hypothalamiques conservant la connexion du nerf optique avec les SCN, la stimulation de ce nerf entraîne des potentiels post-synaptiques pouvant être enregistrés sur les neurones suprachiasmatiques. Cette réponse des neurones des SCN est fortement inhibée en présence de 5-HT ou de 8-OH-DPAT (Rat : Liou *et al.*, 1986, Hamster : Rea *et al.*, 1994).

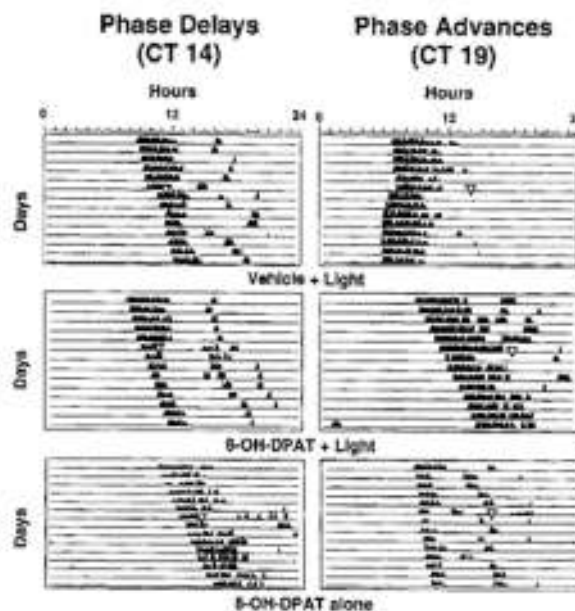


Figure 13 : Effet d'une injection systémique de la 8-OH-DPAT chez le Hamster sur les décalages de phase du rythme d'activité locomotrice obtenus par une stimulation lumineuse.

D'après Rea *et al.*, 1994.

Ainsi, il apparaît que la modulation de la synchronisation photique par la 5-HT nécessite l'action des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et/ou 5-HT<sub>7</sub>. Le blocage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> par un antagoniste spécifique, le WAY-100635, potentialise l'effet du créneau lumineux sur l'activité locomotrice chez le Hamster (Smart & Biello, 2001). Il en est de même pour l'induction de c-FOS par la lumière, qui est potentialisée par l'administration du NAN-190, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Rea *et al.*, 1995). Cette implication des récepteurs

5-HT<sub>1A</sub> semble s'effectuer directement sur les neurones des SCN, et/ou sur les corps cellulaires des neurones du Raphé. Quant aux récepteurs 5-HT<sub>7</sub> (Lovenberg *et al.*, 1993), ils ont été localisés sur les neurones des SCN, des IGL et ceux du Raphé (Duncan *et al.*, 1999). Le rôle des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> dans la réponse des neurones suprachiasmatiques à une stimulation photique a été démontré chez le Hamster. En effet, *in vivo*, l'action inhibitrice de la 5-HT sur la décharge neuronale des SCN induite par une stimulation lumineuse est atténuée par l'application d'agonistes du récepteur 5-HT<sub>7</sub> (Ying & Rusak, 1997). Le même effet est retrouvé *in vitro* sur des préparations de tranches hypothalamiques (Smith *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que la 5-HT pourrait moduler la libération du GLU à partir des terminaisons du RHT *via* les récepteurs 5-HT<sub>7</sub>, cet effet a été confirmé expérimentalement (Srkalovic *et al.*, 1994). Une action de la 5-HT sur les récepteurs 5-HT<sub>7</sub> localisés sur les neurones du Raphé n'est cependant pas à exclure totalement. Chez le Hamster âgé, une corrélation entre la diminution du nombre des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> dans le Raphé dorsal (Duncan *et al.*, 1999) et l'effet plus faible de la 8-OH-DPAT sur les déphasages induits par la lumière (Penev *et al.*, 1997) permettrait de renforcer cette hypothèse.

Parmi les autres classes de récepteurs sérotoninergiques, le rôle des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> dans la modulation de la synchronisation photique a été bien documenté chez le Rat, la Souris et le Hamster. L'expression de c-Fos dans les SCN et les déphasages de l'activité locomotrice induits par un flash de lumière diminuent considérablement lorsque ces récepteurs sont activés (Pickard *et al.*, 1996). Généralement, la distribution de ces récepteurs dans le système nerveux central est pré-synaptique où ils modulent la libération de divers neurotransmetteurs (Pauwels, 1997). Concernant les structures du système circadien, les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> ont été localisés sur les terminaisons du RHT et du GHT (Manrique *et al.*, 1999). *In vivo*, la perfusion locale d'agonistes 5-HT<sub>1B</sub> entraîne une diminution de la libération du GLU dans les SCN (Srkalovic *et al.*, 1994). Parallèlement, *in vitro*, l'application d'agonistes 5-HT<sub>1B</sub> sur des tranches contenant les SCN, inhibe les potentiels post-synaptiques excitateurs déclenchés par la stimulation du nerf optique (Pickard *et al.*, 1999, Jiang *et al.*, 2000) et cet effet est bloqué par le GLU (Pickard *et al.*, 1999). Les Souris dépourvues de récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, présentent des perturbations dans les réponses photiques se manifestant par un rallongement de la période endogène en lumière constante (Sollars *et al.*, 2002) et une perte de synchronisation de l'activité locomotrice par les cycles LD inférieurs à 23 h (Sollars *et al.*, 2006a). L'induction de la protéine c-FOS dans les SCN suite à une stimulation lumineuse est

diminuée chez ces Souris (Sollars *et al.*, 2006b), contrairement à ce dont on pouvait s'attendre étant donné l'effet inhibiteur des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> décrit précédemment. Ces observations seraient dues à l'absence des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> sur les terminaisons GABAergiques de ces Souris mutantes, conduisant ainsi à l'absence de l'inhibition de la transmission GABAergique dans les SCN (Bramley *et al.*, 2005). Ainsi, la transmission GABAergique qui inhibe la libération du GLU dans les SCN (Jiang *et al.*, 1995), serait responsable de l'atténuation des réponses photiques constatée chez ces Souris (Sollars *et al.*, 2006b).

Chez le Rat, les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> des SCN seraient impliqués dans l'effet de type photique de la quipazine, un agoniste sérotoninergique non-spécifique. En effet, l'application de cet agoniste induit des déphasages du rythme d'activité locomotrice qui sont similaires à ceux provoqués par un créneau lumineux (Kohler *et al.*, 1999). La lésion du RHT induit une suppression de ces déphasages (Graff *et al.*, 2005). D'autre part, l'application d'un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> est capable de reproduire ces déphasages (Graff *et al.*, 2007), permettant de suggérer une action de la quipazine sur la libération du GLU à partir du RHT.

Enfin, sur le plan moléculaire, la 5-HT bloque l'induction de l'expression des gènes *Per1* et *Per2* par le GLU dans les SCN, permettant de renforcer le rôle modulateur de ce neurotransmetteur dans la synchronisation photique (Sanggaard *et al.*, 2003).

## **2. Intégration des informations non photiques**

Dans le système circadien, les neurones sérotoninergiques intègrent les informations non photiques et les acheminent ensuite vers les SCN et les IGL. L'intégrité de ces voies est nécessaire pour l'expression des propriétés chronobiotiques du triazolam, une benzodiazépine qui provoque des déphasages de type non photique de l'activité locomotrice chez le Hamster (Cutrera *et al.*, 1994a ; Schuhler *et al.*, 1999). De plus, chez des Rats soumis à une restriction calorique, la lésion spécifique des fibres sérotoninergiques des SCN aboutit à une diminution de l'effet synchroniseur de ce régime sur le rythme de température corporelle (Challet *et al.*, 1997a). Comme la plupart des stimuli non photiques, une stimulation sérotoninergique entraîne une diminution de l'expression des gènes *Per1* et *Per2* dans les SCN, en milieu de jour subjectif (Horikawa *et al.*, 2000 ; Caldelas *et al.*, 2005).

Le rôle fonctionnel de la 5-HT dans la synchronisation non photique se traduit par la capacité des agonistes sérotoninergiques à induire une avance de phase du pic d'activité électrique des neurones suprachiasmatiques en milieu de jour subjectif (Figure 14, Shibata *et al.*, 1992b ; Medanic & Gillette, 1992). Les déphasages du pic d'activité électrique induits par la 5-HT *in vitro* seraient dus principalement à l'implication des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> présents dans les SCN (Sprouse *et al.*, 2004b). Outre les récepteurs 5-HT<sub>7</sub>, un rôle joué par les récepteurs 5-HT<sub>5A</sub> des SCN n'est pas à exclure ; en effet, l'application d'antagonistes sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>5A</sub> révèle leur capacité à bloquer les déphasages non photiques de l'activité électrique des neurones des SCN (Sprouse *et al.*, 2004a). De plus, l'étude de ces déphasages non photiques chez les Souris dépourvues du récepteur 5-HT<sub>7</sub> soulève l'implication potentielle des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Sprouse *et al.*, 2005).

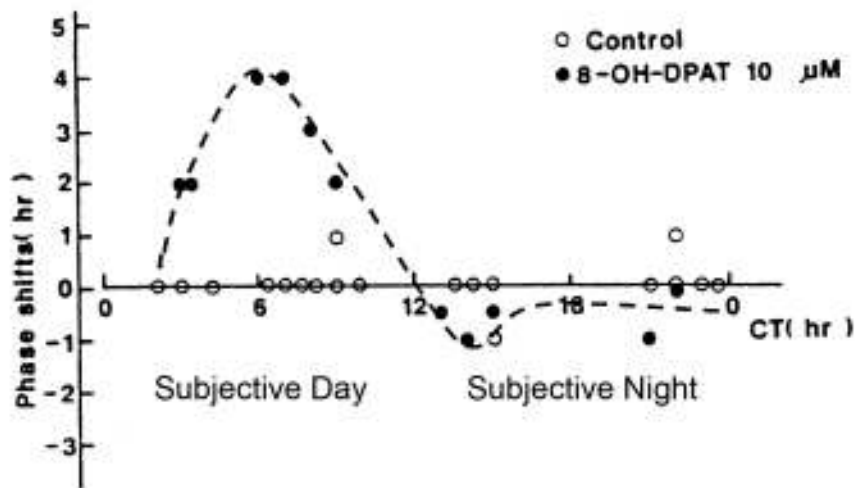


Figure 14 : La 8-OH-DPAT, un agoniste sérotoninergique entraîne des déphasages non photiques de l'activité électrique des neurones suprachiasmatiques enregistrés *in vitro*.

Modifié d'après Shibata *et al.*, 1992b.

La capacité de la 5-HT à induire des déphasages de type non photique de l'activité électrique des neurones suprachiasmatiques *in vitro* a été bien documentée chez le Rat et la Souris. Cependant, les études réalisées *in vivo* utilisent souvent le Hamster syrien, chez qui les agonistes sérotoninergiques sont capables d'induire des déphasages de type non photique de l'activité locomotrice. Un tel effet sur l'activité locomotrice est difficilement mis en évidence chez le Rat, laissant suggérer, chez cette espèce, une sensibilité moindre du système sérotoninergique *vis-à-vis* des stimuli non photiques. Des différences concernant le



fonctionnement et/ou l'organisation des afférences sérotoninergiques au sein du système circadien pourraient être à l'origine de ces différences inter-espèces. L'implication de classes différentes de récepteurs sérotoninergiques localisés dans les Raphés, les SCN et les IGL pourrait être caractéristique de chacune des espèces étudiées. De plus, chez le Rat uniquement, les SCN sont innervés par une voie de projection directement issue du Raphé dorsal (Kawano *et al.*, 1996 ; Moga & Moore 1997). Une autre différence entre les deux espèces concerne les projections mENKergiques issues des IGL. Chez le Hamster, et contrairement au Rat, ces projections parviennent aux SCN (Card & Moore, 1989 ; Morin & Blanchard, 1995) et sont impliquées dans les déphasages non photiques de l'activité locomotrice (Byku & Gannon, 2000).

Concernant les effets observés *in vivo* chez le Hamster, des déphasages de type non photique du rythme d'activité locomotrice peuvent être induits à la suite d'une injection systémique de 8-OH-DPAT (Tominaga *et al.*, 1992a) ou encore par une stimulation électrique des neurones du Raphé (Meyer-Bernstein & Morin 1999). Les afférences sérotoninergiques des SCN, mais pas celles des IGL, sont nécessaires pour l'induction des déphasages du rythme d'activité locomotrice par la 8-OH-DPAT (Schuhler *et al.*, 1998 ; 1999). Néanmoins, le fait que ces déphasages soient bloqués à la suite d'une lésion bilatérale des IGL (Schuhler *et al.*, 1999) laisse supposer que l'action de la 8-OH-DPAT serait transmise *via* cette structure thalamique. L'action de la 8-OH-DPAT pourrait induire la libération des neurotransmetteurs du GHT dans les SCN potentialisant ainsi les déphasages non photiques. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'application de la 8-OH-DPAT dans les IGL est capable d'entraîner des déphasages non photiques de l'activité locomotrice (Challet *et al.*, 1998). D'autre part, la perfusion de la 8-OH-DPAT dans les SCN semble être suffisante pour induire les déphasages non photiques (Challet *et al.*, 1998) qui sont bloqués par la perfusion d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> (Ehlen *et al.*, 2001). De ce fait, l'action de la 8-OH-DPAT sur les récepteurs 5-HT<sub>7</sub> des SCN participerait à la mise en place des déphasages non photiques.

**En résumé, les afférences sérotoninergiques des SCN modulent la synchronisation des rythmes circadiens par la lumière et influencent notamment la transmission glutamatergique dans les terminaisons du RHT. De plus, les neurones sérotoninergiques intègrent et acheminent les informations non photiques vers les SCN mais aussi les IGL. L'organisation anatomique et le fonctionnement des neurones sérotoninergiques à l'origine de ces voies impliquées dans la synchronisation circadienne seront détaillés dans la partie suivante.**

## **C. Les neurones sérotoninergiques dans le système circadien**

L'implication de la 5-HT dans la synchronisation des rythmes biologiques soulève la question du rôle exact des neurones sérotoninergiques au sein du système circadien. En effet, la plupart des études ont porté sur le rôle de la 5-HT dans l'entraînement des rythmes circadiens, alors que le fonctionnement du système sérotoninergique sur une échelle circadienne ou même photopériodique est peu documenté. L'étude de ce fonctionnement est essentielle pour mieux comprendre les effets de la 5-HT non seulement au sein des SCN et des IGL, mais aussi dans les autres régions cérébrales contenant des terminaisons sérotoninergiques.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord décrire l'anatomie des noyaux du Raphé à l'origine des afférences sérotoninergiques du système circadien. La régulation de la synthèse de 5-HT au sein des neurones sérotoninergiques sera exposée par la suite. Finalement, nous présenterons une analyse bibliographique concernant le fonctionnement rythmique des neurones sérotoninergiques.

### **I. Anatomie des neurones sérotoninergiques impliqués dans le système circadien**

Dans le système nerveux central, les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques se situent le long de la ligne médiane et s'étendent du pons jusqu'au mésencéphale. Ces neurones expriment une signature électrique particulière qui se traduit par une décharge lente et extrêmement régulière (Aghajanian, 1982). En se référant à leur position médiane dans le cerveau, ces groupes de neurones ont été appelés Raphé (terme emprunté au latin et signifiant saillie médiane). L'ensemble des noyaux du Raphé chez le Rat représente environ 20 000 neurones sérotoninergiques (Winklund *et al.*, 1981). Si l'on considère l'axe caudo-rostral, on retrouve successivement les noyaux du Raphé pallidus, obscurus, magnus, pontis, médian, dorsal, linearis et latéral (Figure 15).

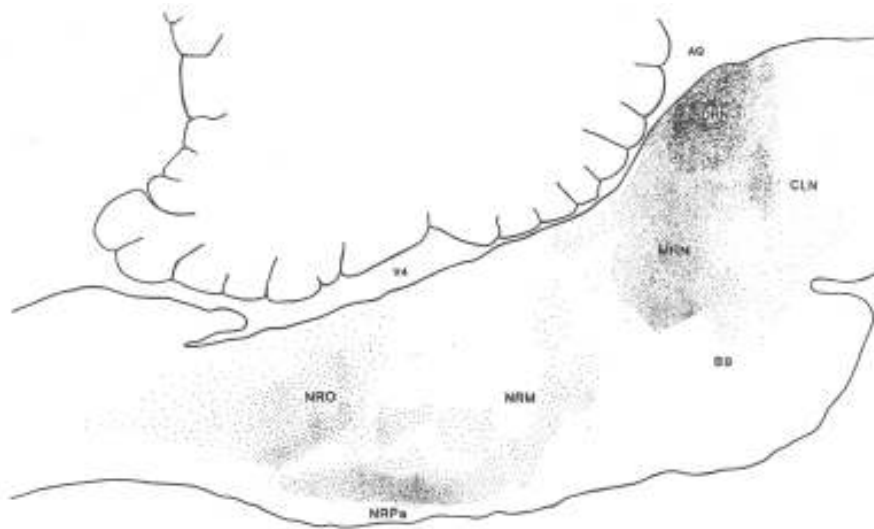


Figure 15 : Représentation de l'ensemble des noyaux du Raphé sur un schéma de coupe sagittale du cerveau de Chat. Sont retrouvés successivement, les noyaux du Raphé obscurus (NRO), pallidus (NRPa), magnus (NRM), médian (MRN, englobant le Raphé pontis, dans cette nomenclature), dorsal (DRN), linearis (CLN) et latéral (B9). AV : 4<sup>ème</sup> ventricule, AQ : aqueduc cérébral.

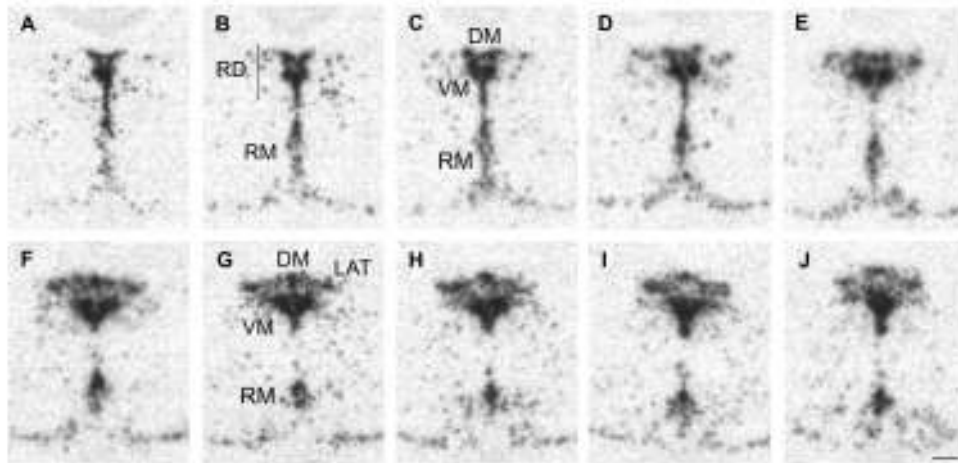
D'après Jacobs & Azmitia, 1992.

Les neurones sérotoninergiques émettent des projections dans de nombreuses régions cérébrales s'étendant de la moelle épinière jusqu'au cortex cérébral. Les régions antérieures telles que le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale et le striatum reçoivent des afférences sérotoninergiques issues principalement des noyaux du Raphé médian et dorsal. Quant aux noyaux du Raphé les plus caudaux, ils projettent essentiellement vers la moelle épinière (pour revue voir Jacobs & Azmitia, 1992).

Les noyaux du Raphé médian et dorsal présentent un intérêt particulier dans le cadre de l'étude du système circadien puisqu'ils sont à l'origine de l'innervation sérotoninergique des SCN et IGL.

**Le Raphé médian (RM)** est situé dans la région ventrale du pons et s'étend depuis le noyau du tegmentum ventral jusqu'à la décussation des pédoncules cérébelleux supérieurs. Ce noyau se trouve dans une position centrale et ses limites latérales sont marquées par la présence de vaisseaux sanguins (Törk, 1985). Le pôle caudal du RM et l'extrémité rostrale du Raphé pontis sont dans la continuité l'un de l'autre. Chez le Rat, le RM renferme environ 1.100 neurones sérotoninergiques (Winklund *et al.*, 1981), dont les corps cellulaires ont une morphologie hétérogène puisque certains sont ellipsoïdes de petite taille et d'autres fusiformes

de taille moyenne. La majorité des neurones sérotoninergiques est située dans la partie médiane de ce noyau (Törk, 1985). Quelques neurones à dopamine ont été identifiés dans le RM chez le Rat (Ochi & Shimizu, 1978 ; Reymann *et al.*, 1983). L'anatomie du RM en fonction de l'axe caudo-rostral chez le Rat est représentée sur la figure 16.



*Figure 16 : Anatomie caudo-rostrale des noyaux du Raphé dorsal et médian (RD et RM respectivement) représentée sur des coupes frontales d'un cerveau de Rat grâce à la détection de l'ARNm de la tryptophane hydroxylase-2 par hybridation in situ radioactive. Le RD est subdivisé en trois groupes : dorsomédian (DM), ventromédian (VM) et latéral (LAT). Le DM et le VM sont visualisés sur l'ensemble des planches, les LAT sur les planches E à J. Barre d'échelle : 500 µm.*

**Le Raphé dorsal (RD)** est le noyau le plus étendu de l'ensemble des noyaux du Raphé (Steinbusch, 1981). Chez le Rat, il s'étend sur environ 3 mm depuis la limite caudale du noyau oculomoteur jusqu'au pôle rostral du noyau tegmentaire latéro-dorsal de Castali. La majorité des neurones du RD est localisée dans le mésencéphale, en position dorsale par rapport au faisceau longitudinal médian. La partie dorsale du RD est située dans la substance grise périaqueducale. Chez le Rat, le diamètre moyen des corps cellulaires des neurones sérotoninergiques du RD varie entre 14 et 35 µm (Steinbusch, 1981). Dans l'extension caudo-rostrale du RD, sa morphologie et sa taille peuvent varier (Figure 16). Le RD caudal est étroit et situé sur la ligne médiane, puis il s'élargit latéralement dans sa région rostrale et peut être subdivisé en trois groupes: **le dorsomédian (DM)**, **le ventromédian (VM)** qui contient la majorité des cellules sérotoninergiques du RD et **deux groupes latéraux (LAT)**. Les corps

cellulaires des neurones sérotoninergiques du DM sont fusiformes et de taille moyenne, ceux du VM sont ronds et de petite taille et ceux des LAT sont larges et multipolaires (Törk, 1985).

Le RD représente le plus grand regroupement de neurones à 5-HT du système nerveux central et contient, chez le Rat, 24 000 neurones parmi lesquels environ 11 500 sont de nature sérotoninergique (Winklund *et al.*, 1981 ; Descarries *et al.*, 1982). Parmi les neurones non sérotoninergiques, le RD contient des neurones noradrénergiques larges et multipolaires (Grzanna *et al.*, 1978), des neurones ENKergiques (Glazer *et al.*, 1981), des neurones dopaminergiques situés sur la ligne médiane (Ochi & Shimizu, 1978) et aussi des neurones GABAergiques (Stamp & Semba, 1995 ; Charara & Parent, 1998). La présence de ces derniers dans le RD est attestée par des enregistrements électrophysiologiques montrant leurs caractéristiques de décharge neuronale (Allers & Sharp, 2003 ; Jankowski & Sesak, 2004 ; Varga *et al.*, 2001). Le nombre des neurones GABAergiques dans le RD diminue après lésion neurochimique des neurones sérotoninergiques (Gamrani *et al.*, 1979), suggérant une éventuelle co-expression des deux neurotransmetteurs (Stamp & Semba, 1995). Finalement, une coexpression de la 5-HT et de la SP a été mise en évidence dans les neurones du RD (Chan-Palay *et al.*, 1978).

## II. Synthèse de 5-HT

La 5-HT a d'abord été identifiée à partir d'extraits de cerveau en tant que substance entraînant une contraction des vaisseaux sanguins (Rapport *et al.*, 1948). Plus tard, la même molécule a été isolée dans les cellules entérochromaffines de la muqueuse intestinale (Erspamer & Asero, 1952). Puis grâce aux techniques histochimiques, la 5-HT a été identifiée dans les neurones du système nerveux central (Dahlstrom & Fuxe, 1964). La 5-HT est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (sommeil, nociception, motricité intestinale, réponses immunitaires), comportements (prise alimentaire, comportement sexuel) ainsi que dans divers dysfonctionnements psychologiques et psychiatriques (dépression, schizophrénie) (pour revue voir Lucki, 1998).

La synthèse de la 5-HT s'effectue à partir de l'acide aminé L-tryptophane (L-trp) apporté par l'alimentation et parvenant au système nerveux central grâce à des transporteurs spécifiques. La figure 17 montre les différentes étapes enzymatiques impliquées dans le métabolisme de la 5-HT. Le L-trp est hydroxylé pour former le 5-hydroxytryptophane

(5-HTP), faisant intervenir l'enzyme **tryptophane hydroxylase (TPH, EC 1.14.16.4)**, **enzyme limitante de cette voie de biosynthèse** (Lovenberg *et al.*, 1967; Jéquier *et al.*, 1969). Le 5-HTP subit alors une décarboxylation rapide impliquant une décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC, Boadle-Biber, 1993) et produisant ainsi la 5-hydroxytryptamine ou sérotonine (5-HT). L'AADC est une enzyme cytoplasmique largement distribuée dans le cerveau et elle intervient dans la synthèse d'autres neurotransmetteurs dont les voies de biosynthèse impliquent des acides aminés aromatiques (Hokfelt *et al.*, 1973). Cette enzyme, exprimée en excès dans le cerveau, et dont l'activité enzymatique est 50 à 100 fois supérieure à celle de la TPH, n'est pas considérée limitante pour la biosynthèse de la 5-HT.

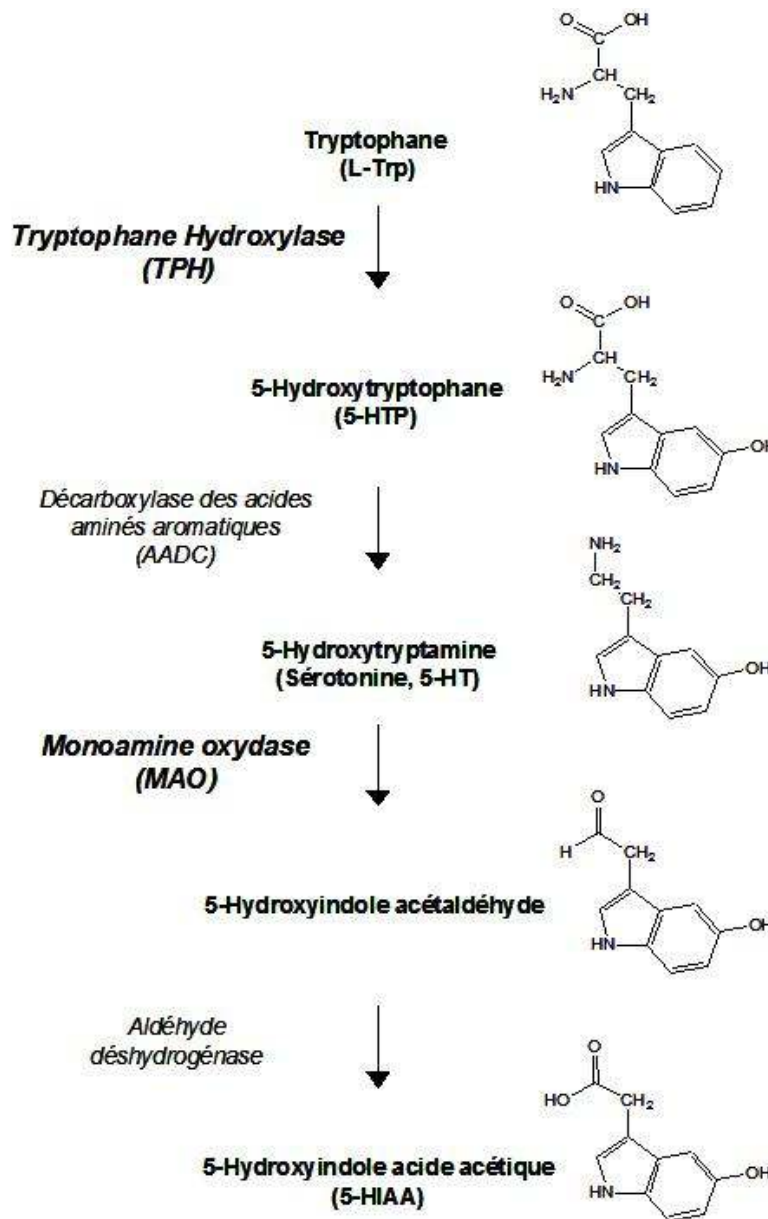


Figure 17 : Voie de synthèse et de dégradation de la Sérotonine. L'étape limitante dans la synthèse est celle faisant intervenir l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPH).

Avant sa libération, la 5-HT se trouve liée à une protéine spécifique, la *Serotonin Binding Protein* (SBP), l'ensemble formant le complexe 5-HT-SBP (Gershon *et al.*, 1983). La SBP serait impliquée dans le stockage de la 5-HT dans les vésicules synaptiques et assurerait également son transport et sa protection contre la dégradation par les oxydases présentes dans l'élément pré-synaptique (pour revue voir Del Rio *et al.*, 1995). Une fois libérée dans la fente synaptique, le complexe SBP-5-HT se dissocie permettant la liaison de la 5-HT sur ses récepteurs spécifiques dont sept classes différentes sont actuellement connues (pour revue voir Hoyer *et al.*, 2002). L'excès de 5-HT libérée est rapidement éliminé de l'espace extracellulaire, grâce à un transporteur spécifique (5-HTT). Le 5-HTT se trouve sur les neurones sérotoninergiques des Raphés (Zhou *et al.*, 1998) mais aussi sur les neurones non-sérotoninergiques et les cellules gliales (Pickel & Chan, 1999). Dans le milieu intracellulaire, la 5-HT est rapidement catabolisée par l'action successive de la monoamine oxydase (MAO) et de l'aldéhyde déshydrogénase pour donner le 5-HIAA (5-hydroxyindole acide acétique, figure 17).

Plusieurs éléments intervenant dans la synthèse et le catabolisme de la 5-HT peuvent moduler les quantités de neurotransmetteur présent dans le milieu extracellulaire. Parmi ces éléments, nous allons considérer l'implication de l'acide aminé L-trp, le précurseur de la 5-HT, ainsi que celle de la TPH, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT.

### **1. L'acide aminé L-tryptophane (L-trp)**

Le L-trp est un acide aminé essentiel intervenant dans la construction de la majorité des protéines. Une fois dans la circulation sanguine, le L-trp est transporté dans les différents organes, tissus et cellules grâce à des transporteurs spécifiques appartenant à la famille des transporteurs des acides aminés L (*L-type amino acid transporter, LAT*, Christensen, 1990). Dans le cerveau, ces transporteurs interviennent à la fois au niveau de la barrière hémato-encéphalique et de la membrane plasmique des neurones et des cellules gliales. Deux transporteurs appartenant à cette famille seraient impliqués dans le transport du L-trp : le LAT1 (Kanai *et al.*, 1998 ; Prasad *et al.*, 1999) et le LAT2 (Segawa *et al.*, 1999), possédant tous deux une affinité différente *vis-à-vis* des différents acides aminés L (Kanai & Endou, 2003). Le transporteur LAT1 est particulièrement sélectif des acides aminés L-aromatiques, dont fait partie le L-trp. L'affinité du LAT2 *vis-à-vis* du L-trp est moindre et il interviendrait plutôt dans le transport des acides aminés de petite taille tels que la glycine, l'alanine ou

encore la sérine (Kanai *et al.*, 1998 ; Segawa *et al.*, 1999). De plus, la cinétique du transport du L-trp par le LAT1 (Boado *et al.*, 1999) se rapproche de celle déjà établie *in vivo* pour le transport de cet acide aminé à travers la barrière hémato-encéphalique (Miller *et al.*, 1985). Si l'implication du LAT1 dans le processus du transport de L-trp vers le cerveau est clairement établie, celle du LAT2 demeure controversée (Boado *et al.*, 1999 ; Kanai & Endou, 2003). L'expression de ces deux transporteurs a été mise en évidence dans le système nerveux central grâce à la technique de Northern Blot, mais la nature des cellules qui expriment ces transporteurs (neurones, cellules gliales) n'a pas été étudiée. L'étude de la localisation cellulaire de ces deux transporteurs dans les neurones du Raphé paraît essentielle afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs dans le transport de L-trp vers les neurones sérotoninergiques.

#### *L'apport en L-trp peut-il entraîner une rythmicité de synthèse de 5-HT ?*

Les concentrations physiologiques de L-trp mesurées dans le cerveau ne sont pas suffisantes pour saturer la TPH, de ce fait, cet acide aminé peut influencer les quantités de 5-HT synthétisées dans les neurones du Raphé. Un régime alimentaire carencé en trp entraîne chez le Rat une forte diminution des quantités de 5-HT et de 5-HIAA mesurées dans le cerveau (Gessa *et al.*, 1974). À l'inverse, un régime alimentaire enrichi en protéine de 12 %, 24 % ou 40 % ne modifie pas les concentrations cérébrales de L-trp (Fernstrom *et al.*, 1987). Une élévation de 80 à 100 % des concentrations de L-trp dans le cerveau (par un régime alimentaire enrichi) entraîne une augmentation modérée, de l'ordre de 10 à 15 %, des quantités totales de 5-HT et de 5-HIAA (Leathwood, 1989). Le L-trp peut activer des dioxygénases spécifiques capables de catalyser sa conversion en Kynurénine, le rendant ainsi indisponible pour la biosynthèse de 5-HT (Sun, 1989). De plus, mesurée *in vitro*, l'activité enzymatique de ces oxygénases augmente de 5 à 6 fois pour des concentrations supraphysiologiques de L-trp (Smith & Pogson, 1980), ce qui expliquerait la faible augmentation des quantités de 5-HT observée suite à un régime enrichi en L-trp.

Sur une échelle journalière, les concentrations plasmatiques de L-trp varient avec la période du nourrissage, nocturne ou diurne selon les espèces. Ainsi, les concentrations plasmatiques de L-trp chez le Rat atteignent un pic en milieu de la phase nocturne (Hillier & Redfern, 1977) mais ces variations ne semblent pas se retrouver dans le cerveau. Chez le Rat, le transport de L-trp radioactif mesuré *in vitro* dans des préparations tissulaires de cortex



cérébral est plus important pendant le jour, période pendant laquelle l'apport alimentaire en L-tryptophane est quasi absent chez cet animal nocturne (Loizou & Redfern, 1988). Ainsi, ce transport rythmique pourrait contrebalancer les variations journalières des concentrations plasmatiques de L-tryptophane afin d'assurer des niveaux constants de cet acide aminé au sein des neurones. Ces résultats suggèrent que les variations journalières, d'origine alimentaire, de L-tryptophane n'influenceraient pas le taux de synthèse de 5-HT pendant le cycle jour/nuit. L'étude de l'expression et du fonctionnement du transporteur LAT1, et éventuellement LAT2, dans le cerveau sur une échelle de 24 h serait nécessaire pour confirmer l'hypothèse d'un transport différentiel du L-tryptophane.

## 2. La tryptophane hydroxylase (TPH)

La TPH est une protéine cytoplasmique exprimée dans les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques du Raphé, où elle catalyse la biosynthèse de 5-HT. Dans les prolongements axonaux et dendritiques, la TPH semble être associée aux microtubules (Joh *et al.*, 1975 ; Cohen *et al.*, 1995) permettant ainsi son transport à partir des somas jusqu'aux aires de terminaisons, lieu de biosynthèse et de libération de 5-HT. En dehors du système nerveux central, la TPH est présente dans les pinéaloctes (où elle participe à la synthèse de mélatonine ; Ichiyama *et al.*, 1976 ; Sudgen, 1989), la rétine (Bernard *et al.*, 1999 ; Liang *et al.*, 2004), les mastocytes (Finocchiaro *et al.*, 1991), les cellules entérochromaffines (Weber & Horita, 1965) et enfin dans les neurones entériques (Gershon *et al.*, 1977).

### • *Historique*

Plusieurs équipes ont étudié l'expression de la TPH dans les noyaux du Raphé comme dans la glande pinéale. Un ADNc codant le gène de la TPH a été isolé à partir de la glande pinéale du Rat en 1986 par Darmon et collaborateurs. La même équipe a décrit une expression de l'ARNm de la TPH 150 fois plus élevée dans la glande pinéale que dans le RD (Dumas *et al.*, 1989). En revanche, les quantités de protéine TPH sont trois fois plus importantes dans les noyaux du Raphé que dans la glande pinéale (Figure 18). L'étude des caractéristiques de la TPH dans ces deux structures a permis de mettre en évidence certaines différences qui pourraient expliquer ces résultats. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que le rendement de la traduction des ARNm de la TPH est différent suivant que l'on considère les

noyaux du Raphé ou la glande pinéale (Dumas *et al.*, 1989). Des différences dans la durée de demi-vie de la protéine TPH ont également été mises en évidence et précisent que dans la glande pinéale, la TPH aurait une demi-vie de 75 minutes (Sitaram & Lees, 1978) alors que celle exprimée dans les Raphés est renouvelée tous les 1.5 à 3.5 jours (Meek & Neff, 1972 ; Weissmann *et al.*, 1990). De plus, il a été suggéré que des maturations post-traductionnelles différentielles seraient à l'origine des quantités différentes de TPH en fonction du tissu étudié (Kim *et al.*, 1991). Le point isoélectrique et le pH optimal sont également sensiblement différents entre les deux TPH (Jéquier *et al.*, 1969 ; Kim *et al.*, 1991). Finalement, malgré l'absence de réelle preuve expérimentale, l'hypothèse de la présence de deux gènes distincts dans ces deux structures a été avancée. Des études récentes réalisées en 2003, ont permis en effet de confirmer cette hypothèse (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003).

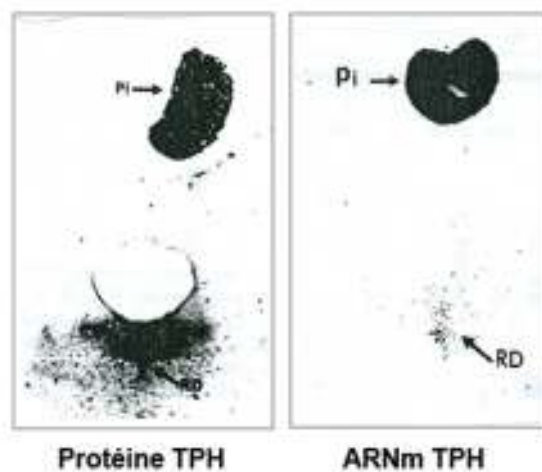


Figure 18 : Différences de quantité d'ARNm et de protéine TPH entre la glande pinéale (Pi) et le RD. La protéine TPH est plus abondante dans le RD par rapport à la pinéale, alors que c'est le contraire pour l'ARNm de la TPH. D'après Dumas *et al.*, 1989.

- **Les Souris déficientes pour le gène *tph***

L'élaboration d'une souche de Souris portant une mutation dans le gène de la TPH a démontré l'existence de deux gènes codant deux enzymes différentes (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003) et a remis en question la majorité des travaux antérieurs. L'inactivation du gène *tph* entraîne la suppression totale de la synthèse de 5-HT dans l'ensemble des tissus périphériques (Figure 19). La 5-HT est indétectable dans le sang, le duodénum et la pinéale de

ces Souris dépourvues du gène *tph*. Par contre, aucune modification des quantités de 5-HT dans le système nerveux central n'est observée (Figure 19). Ces résultats montrent que la synthèse de la 5-HT dans le cerveau est assurée par l'intermédiaire d'un autre gène codant une autre TPH. Les auteurs ont alors cloné et séquencé un nouveau gène *tph* du système nerveux central, nommé *tph2* ou *neuronal tph*, qui se trouve sur le chromosome 10 chez la Souris et qui est responsable de la synthèse de 5-HT dans le système nerveux central et périphérique (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004). Ainsi, "l'ancien" gène *tph* devenu alors *tph1*, localisé sur le chromosome 7 chez la Souris, est exprimé en périphérie et code l'enzyme TPH1 présente dans la glande pinéale, les mastocytes et le duodénum. Les deux protéines TPH présentent un pourcentage d'homologie qui s'élève à 72 % et ce notamment au niveau du domaine catalytique C-terminal.

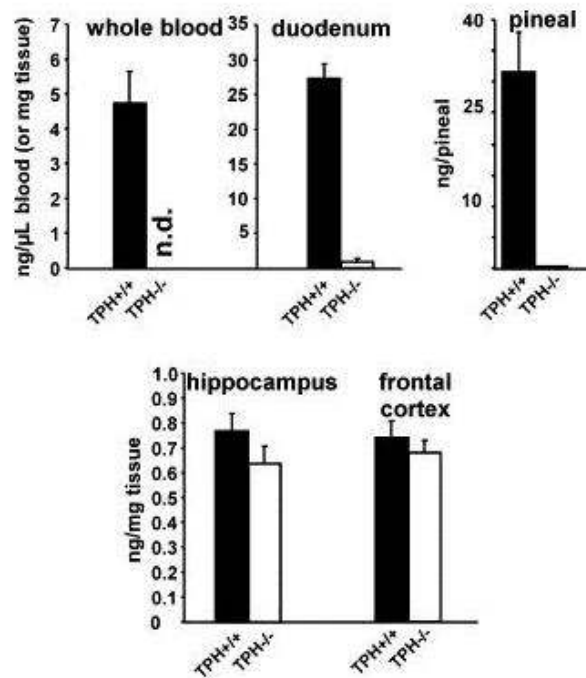


Figure 19 : Quantités totales de 5-HT dans le sang, le duodénum, la pinéale et le système nerveux central (hippocampe et cortex frontal) chez des Souris sauvages (TPH<sup>+/+</sup>) et des Souris dépourvues du gène *tph* (TPH<sup>-/-</sup>). D'après Walther & Bader, 2003.

Finalement, les Souris dépourvues du gène *tph1* ne présentent pas de dysfonctionnements comportementaux associés aux maladies psychiatriques (Walther *et al.*, 2003). Ces résultats soulèvent l'implication du nouveau gène *tph2* dans les effets "centraux" de la 5-HT. Le modèle présenté dans la figure 20, a été proposé par Walther et Bader (2003)

et illustre deux systèmes sérotoninergiques distincts sur le plan génétique. Dans le système nerveux, la biosynthèse de 5-HT est catalysée par la TPH2 qui intervient ainsi dans les rôles centraux de la 5-HT, tels que les dysfonctionnements psychiatriques ou encore les paramètres comportementaux. Dans les tissus périphériques, c'est la TPH1 qui assure la synthèse de la 5-HT qui est impliquée dans le système immunitaire, la synthèse de mélatonine ainsi que dans la régulation de l'homéostasie générale.

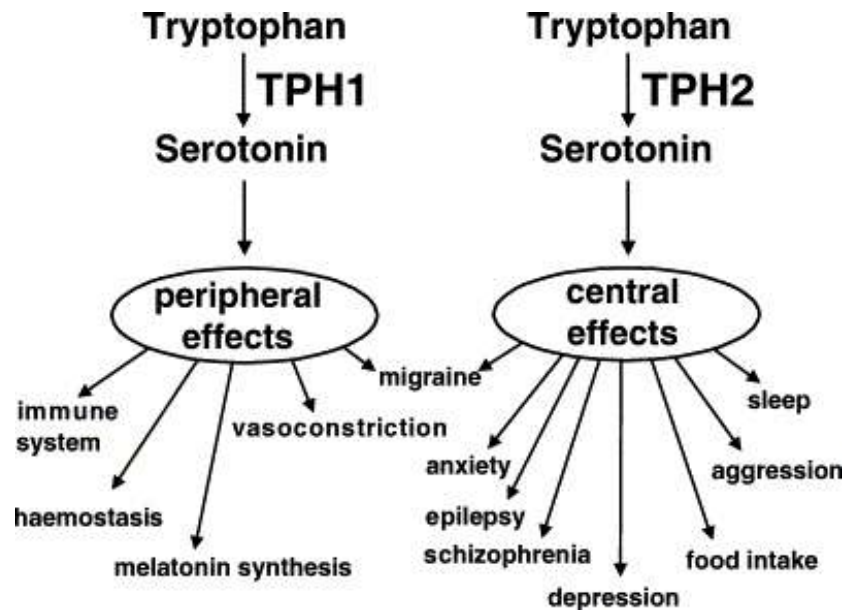


Figure 20 : L'implication des deux gènes *tph* dans la synthèse de la sérotonine reflète une séparation fonctionnelle des rôles de ce neurotransmetteur au niveau central et périphérique.

D'après Walther & Bader, 2003.

- **L'expression des gènes *tph***

Depuis la découverte du gène *tph2*, des sondes spécifiques pour chacun des deux messagers, TPH1 et 2 ont pu être élaborées et plusieurs études ont déterminé leur distribution relative notamment dans les Raphés et la pinéale. Côté et collaborateurs (2003) ont montré que l'ARNm de la TPH2 est bien présent dans le Raphé des Souris sauvages mais aussi dans celui des déficientes pour la *tph1*, alors que l'ARNm de la TPH1 est indétectable dans les Raphés de ces deux souches de Souris (Figure 21). D'autre part, aucune expression de l'ARNm de la TPH2 n'a pu être détectée dans la pinéale. Chez le Rat, la même distribution d'expression de ces deux ARNm dans les Raphés et la pinéale a été retrouvée par hybridation *in situ* (Patel *et al.*, 2004).

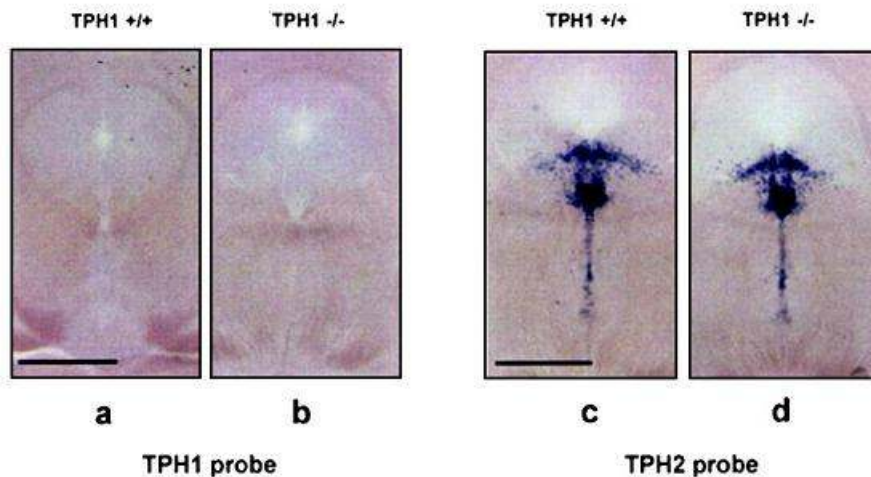


Figure 21 : Expression des ARNm de la TPH1 et la TPH2 dans le RD des Souris sauvages (TPH1<sup>+/+</sup>) et des déficientes pour le gène *tph1* (TPH1<sup>-/-</sup>).  
Barre d'échelle : 1mm. D'après Côté et al., 2003.

Récemment, des anticorps spécifiques des deux TPH ont été développés et il apparaît que la TPH2 est présente dans plusieurs régions cérébrales chez la Souris alors que la TPH1 est exclusivement retrouvée dans la glande pinéale et les mastocytes (Sakowski *et al.*, 2006). Cependant, deux autres études menées chez le Rat ont mis en évidence par RT-PCR, une co-expression des gènes *tph1* et *tph2* dans la glande pinéale (Sugden, 2003) et la rétine (Liang *et al.*, 2004) et montrent que les niveaux d'expression de l'ARNm TPH2 sont très faibles par rapport à ceux de l'ARNm TPH1. Dans le RD, une telle co-expression des deux gènes *tph* a été récemment mise en évidence chez le Rat par RT-PCR (Abumaria *et al.*, 2006 a ; b). De plus, une étude récente a décrit la présence de l'ARNm TPH1 dans le cerveau de la Souris pendant les étapes précoces du développement post-natal (Nakamura *et al.*, 2006). Selon cette étude, l'ARNm de la TPH1 est exprimé dans le cerveau trois semaines après la naissance alors qu'il est indétectable à l'âge adulte. Les niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH1 trois semaines après la naissance sont deux fois moins élevés que ceux de l'ARNm de la TPH2, présent lui à un niveau constant dans le cerveau depuis la naissance.

Même si les premières études semblaient confirmer l'expression exclusive du gène *tph2* dans le système nerveux central, la détection de l'ARNm de la TPH1 dans le Raphé par RT-PCR soulève plusieurs interrogations. La sensibilité de cette dernière technique permet en effet de détecter des niveaux d'expression génique relativement faibles. Toutefois, les souris déficientes pour le gène *tph1* ne présentent aucune diminution des quantités de 5-HT dans le

cerveau (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003), permettant ainsi de rejeter l'implication de la TPH1 dans la synthèse de la 5-HT du système nerveux central. Une exception sera pourtant faite concernant la présence d'une expression du gène *tph1* dans le cerveau pendant le développement post-natal. L'élaboration d'une souche de Souris dont le gène *tph2* aurait été invalidé permettrait de déterminer si le gène *tph1* est exprimé dans le cerveau et d'élucider son rôle dans la biosynthèse de 5-HT au sein des neurones du Raphé.

### **III. Fonctionnement rythmique des neurones sérotoninergiques**

L'implication de la sérotonine dans la synchronisation de l'horloge circadienne laisse supposer l'existence d'un fonctionnement rythmique journalier des neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL. Cette rythmicité pourrait se traduire par des variations journalières de l'activité électrique des neurones du Raphé ou encore de la synthèse et de la libération de 5-HT dans les aires de terminaisons. Des exemples d'une telle rythmicité dans les structures du système circadien, mais aussi dans d'autres régions du cerveau seront présentés dans cette partie.

#### **1. L'activité électrique**

L'activité électrique des neurones sérotoninergiques du RD enregistrés *in vivo* est caractérisée par une décharge rythmique lente et régulière (Mosko & Jacobs, 1977 ; Aghajanian & Vandremaelen, 1983). La décharge spontanée de ces neurones présente une fréquence de l'ordre de 0.5-2.5 Hz (Vandremaelen & Aghajanian, 1983). Les neurones sérotoninergiques enregistrés *in vitro* montrent la même décharge rythmique et régulière (Jacobs & Azmitia, 1992).

L'activité électrique des neurones sérotoninergiques du RD est modulée par le GABA dont l'application entraîne une suppression de l'activité électrique (Gallager & Aghajanian, 1976a) et aussi par la noradrénaline qui exerce une excitation tonique sur ces neurones (Baraban & Aghajanian, 1980). D'autre part, l'activité de décharge des neurones sérotoninergiques varie en fonction du cycle veille/sommeil (Figure 22). L'activité électrique de ces neurones perd son aspect régulier et devient plus lente au fur et à mesure que l'animal entre en phase de sommeil lent. Pendant le sommeil paradoxal, et contrairement à la quasi

totalité des neurones des structures cérébrales, les neurones sérotoninergiques du RD sont silencieux (Trulson & Jacobs, 1979). La suppression de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques pendant les différentes phases de sommeil serait due en partie à l'activation de la transmission GABAergique issue du RD (Stamp & Semba, 1995) et/ou d'autres structures du cerveau, telles que l'hypothalamus latéral et l'aire préoptique latérale (Gervasoni *et al.*, 2000). Des expériences électrophysiologiques ont démontré que ce profil d'activité électrique variable en fonction du cycle veille/sommeil se retrouve non seulement dans le RD, mais dans d'autres noyaux du Raphé tels que le RM, les Raphés magnus, obscurus et pallidus (Jacobs & Fornal, 1991).

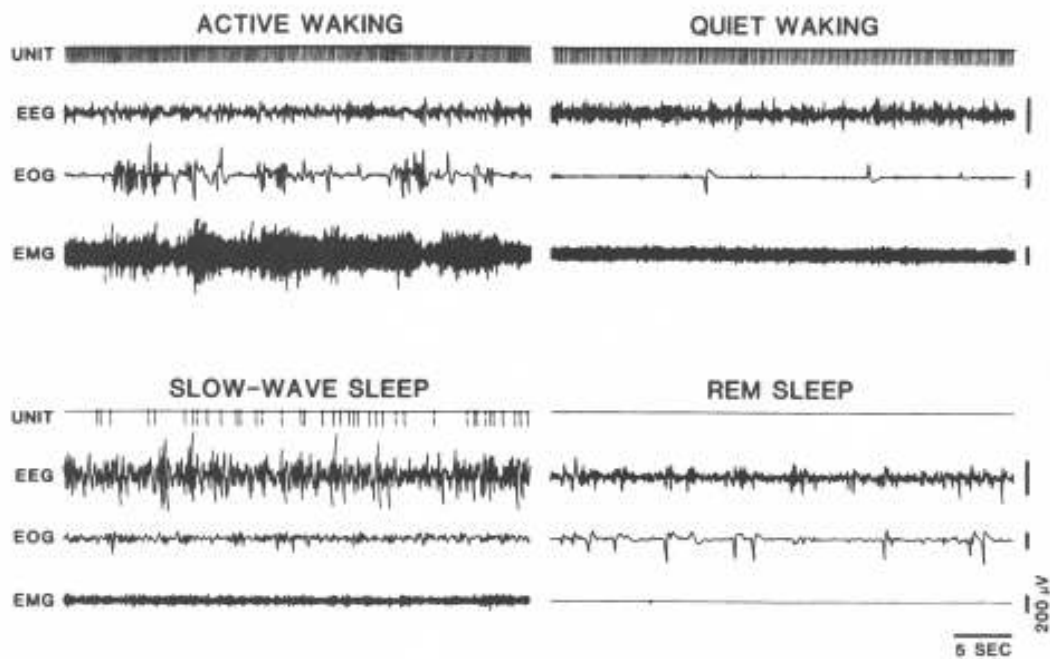


Figure 22 : Suivi de l'activité électrique d'un neurone sérotoninergique du RD (UNIT), de l'électroencéphalogramme (EEG), de l'électrooculogramme (EOG) et de l'électromyogramme (EMG) chez le Rat *in vivo*, pendant la veille (haut) et le sommeil lent et paradoxal (bas).

D'après Jacobs & Azmitia, 1992.

## 2. La libération rythmique de 5-HT

Des variations rythmiques de la libération de 5-HT ainsi que des quantités totales de 5-HT ont été mises en évidence dans plusieurs régions cérébrales. L'ensemble des résultats révèlent des augmentations des niveaux de 5-HT pendant la nuit, ce qui correspond à la phase d'activité des animaux nocturnes. À titre d'exemple, la libération de 5-HT dans l'hippocampe est rythmique et corrélée avec les périodes d'activité nocturne (Kalén *et al.*, 1989), dans le RD et le cortex frontal, cette libération augmente pendant la période de veille (Portas *et al.*, 1998). De même, les quantités totales de 5-HT mesurées dans le RD (Pinato *et al.*, 2004), le noyau paraventriculaire hypothalamique (Poncet *et al.*, 1993), le bulbe olfactif ainsi que l'hypothalamus antérieur et médiobasal (Ferraro & Steger, 1990) sont rythmiques.

Dans la région des SCN, une variation circadienne du 5-HIAA avec un pic situé en milieu de nuit a été mise en évidence chez le Rat par voltamétrie (Faradji *et al.*, 1983) mais aussi par la technique de Push-Pull (Ramirez *et al.*, 1987). D'autre part, Poncet et collaborateurs (1993) ont décrit des variations rythmiques des quantités totales de 5-HT dans les SCN avec un pic observé en milieu de nuit. Le profil du 5-HIAA extracellulaire a été mesuré chez le Hamster sibérien par microdialyse et montre une rythmicité avec un pic 2 à 3 h après le début de la nuit (Glass *et al.*, 1992). Chez le Hamster syrien, la libération de 5-HT dans les SCN est également rythmique aussi bien en photopériode longue qu'en obscurité constante (Dudley *et al.*, 1998). La même équipe a montré par la suite que la libération rythmique de 5-HT existait aussi dans la région des IGL chez le Hamster syrien placé en photopériode longue (Grossman *et al.*, 2004). Dans ces deux structures du système circadien, la 5-HT libérée atteint les niveaux les plus élevés juste après la transition jour/nuit. La régulation de la libération de 5-HT dans les SCN a été étudiée chez le Hamster syrien et ferait intervenir une voie multisynaptique RD→RM→SCN. Une stimulation électrique du RD en milieu de jour entraîne une augmentation de la libération de 5-HT dans les SCN (Dudley *et al.*, 1999). Les récepteurs GABAergiques du RM exercent un effet inhibiteur sur cette libération alors que les récepteurs 5-HT<sub>7</sub> du même noyau la potentialisent (Glass *et al.*, 2000 ; 2003).



Chez le Rat, la libération de 5-HT et de 5-HIAA dans les SCN est également rythmique en cycle LD, et le profil de 5-HIAA est maintenu en obscurité constante (Barassin *et al.*, 2002). Le profil journalier de 5-HT présente un pic de libération situé au début de la phase obscure du nyctémère (Figure 23), le pic de 5-HIAA apparaît plus tardivement dans la nuit. **Il existe donc un rythme circadien de libération de ce neurotransmetteur au sein des SCN.**

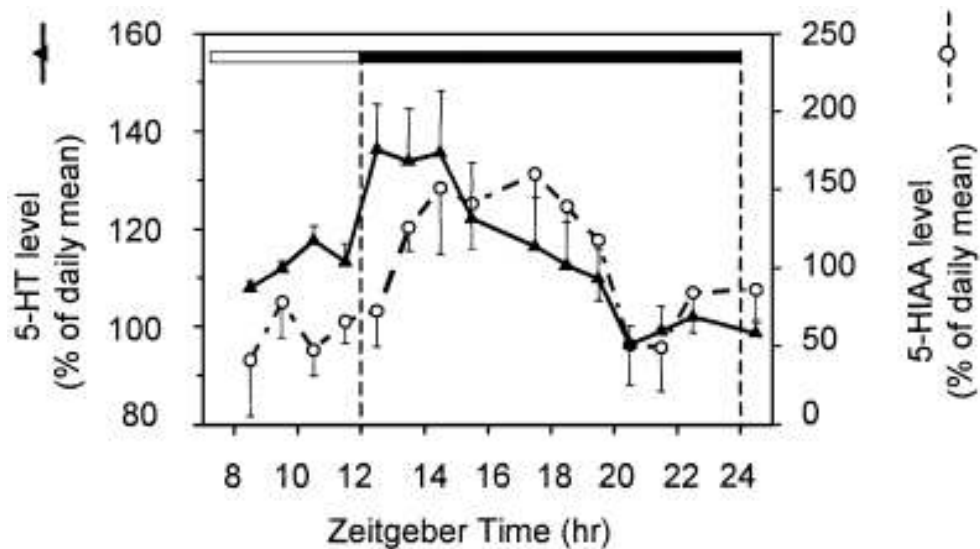


Figure 23 : La libération rythmique de 5-HT et de 5-HIAA mesurée par microdialyse *in vivo* dans les SCN du Rat. D'après Barassin *et al.*, 2002.

### 3. La rythmicité de la TPH

Afin d'ajuster les quantités de 5-HT synthétisée, la TPH peut être régulée sur une échelle de temps courte ou longue. Les régulations à court terme (plusieurs minutes à plusieurs heures) concernent des modifications de l'activité enzymatique de la TPH *via* des processus de phosphorylation. Sur une échelle de temps plus longue (plusieurs jours), des modifications de l'expression du gène codant la TPH2 contrôlent les quantités intracellulaires de cette enzyme.

Sur une échelle de 24 h, l'activité enzymatique de la TPH ainsi que les niveaux d'expression de son gène peuvent présenter des variations rythmiques qui influenceraient les quantités de 5-HT synthétisée durant le nyctémère. L'activité enzymatique de la TPH chez le Rat présente un profil rythmique caractérisé par un pic en fin de nuit dans le RD et le RM

(Kan *et al.*, 1977). Dans le striatum, une région de terminaisons sérotoninergiques, une rythmicité de l'activité de la TPH est également observée, mais avec un décalage de 12 h par rapport aux profils décrits dans le RD et le RM. Ce décalage correspondrait au temps nécessaire pour le transport de la TPH synthétisée dans les somas sérotoninergiques, jusqu'aux terminaisons striatales. Ces mêmes variations rythmiques de l'activité de la TPH dans les RD, le RM et le striatum ont été également constatées chez la Souris (Natali *et al.*, 1980). D'autre part, Poncet et collaborateurs (1993) ont aussi observé un profil rythmique pour l'accumulation du 5-HTP, avec un pic en milieu de nuit aussi bien dans le RD que dans les SCN. Cependant, d'autres études n'ont pu mettre en évidence cette rythmicité ni dans le RD ni dans le striatum (McLennan & Lees, 1978), ni dans les homogénats de la totalité du cerveau (Brown *et al.*, 1982). Une telle disparité entre les résultats des études citées précédemment pourrait être due aux différents protocoles expérimentaux utilisés lors des mesures d'activité enzymatique de la TPH et de la préparation des homogénats tissulaires. McLennan et Lees (1978) et Brown et collaborateurs (1982) évaluent l'activité enzymatique maximale de la TPH *in vitro*. Dans les autres études (Kan *et al.*, 1977 ; Poncet *et al.*, 1993), l'activité spécifique de la TPH a été estimée en mesurant l'accumulation de la 5-HTP après blocage de l'AADC *in vivo*.

Les variations de l'activité enzymatique de la TPH (Kan *et al.*, 1977 ; Natali *et al.*, 1980) sont corrélées avec des variations des concentrations de protéine TPH dans le RM et les SCN, avec un décalage temporel entre ces deux régions (Barassin *et al.*, 2002). Dans le RM, les concentrations de la TPH augmentent en fin de nuit, alors que dans les SCN, ces concentrations présentent une rythmicité circadienne caractérisée par un pic avant la transition jour/nuit. **La synthèse de la 5-HT, évaluée par la mesure des concentrations de la protéine TPH au sein des SCN, présente des variations circadiennes.**

Plusieurs études ont décrit les profils journaliers de l'ARNm et de la protéine TPH dans la glande pinéale et la rétine. Dans les cultures de pinéalocytes de Poulet, l'ARNm (Florez *et al.*, 1996 ; Green *et al.*, 1996) et la protéine (Florez & Takahashi, 1996) TPH présentent des variations circadiennes et les valeurs maximales anticipent l'apparition du pic nocturne de mélatonine. Une étude réalisée chez le Rat, montre que l'ARNm de la TPH dans la pinéale présente un profil bimodal avec un premier pic en début de nuit et un deuxième en début de jour (Besançon *et al.*, 1996). Plus récemment, et après la découverte du gène *tph2*,

Sugden (2003) a décrit les profils journaliers de l'ARNm des TPH1 et 2 dans la pinéale du Rat ; l'expression de la TPH1 est rythmique avec des niveaux élevés pendant la nuit et à la transition nuit/jour, celle de la TPH2 est très faible et ne montre pas de variations rythmiques significatives.

Dans la rétine, la TPH est exprimée dans la couche nucléaire interne, les cellules ganglionnaires et dans les photorécepteurs (Chong *et al.*, 1998 ; Liang *et al.*, 2004). Les niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH dans la rétine du Poulet présentent une rythmicité circadienne et augmentent pendant la nuit (Chong *et al.*, 1998). Plus récemment, Liang et collaborateurs (2004) ont montré que l'expression des ARNm TPH1 et TPH2 dans la rétine du Rat est rythmique avec des niveaux plus élevés pendant la nuit.

**Concernant les noyaux du Raphé, c'est l'isoforme TPH2 qui est responsable de la biosynthèse de 5-HT (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004). Cependant, aucun travail n'a encore porté sur l'étude des variations journalières de l'expression de ce gène dans les neurones sérotoninergiques des Raphés.**

## **D. Les objectifs de la thèse**

Les rôles de la 5-HT dans le système circadien ont été largement étudiés. Ce neurotransmetteur module la synchronisation photique des fonctions circadiennes, il est aussi impliqué dans l'intégration des informations non photiques. Cependant, la régulation de la synthèse de 5-HT dans les structures du système circadien demeure très largement inexplorée. Par exemple, les études qui ont montré des variations rythmiques de l'activité enzymatique de la TPH (Kan *et al.*, 1977 ; Poncet *et al.*, 1993) n'ont nullement examiné l'éventuel caractère circadien de ces variations. De plus, à l'exception de l'étude de Barassin et collaborateurs (2002), les profils journaliers de la protéine TPH n'ont pas été explorés ni ceux de l'expression du gène *tph2*.

**Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude du fonctionnement des neurones sérotoninergiques du RD et du RM en considérant deux paramètres intervenant dans la régulation de la synthèse de 5-HT : la protéine TPH et l'ARNm de la TPH2.**

**Le premier objectif de ce travail a donc été de caractériser une éventuelle synthèse circadienne de 5-HT dans les deux voies neuronales afférentes aux structures clés du système circadien, les SCN et les IGL, en étudiant les profils journaliers des concentrations de protéine TPH dans ces neurones.**

L'étude de Barassin et collaborateurs (2002) réalisée dans notre laboratoire, a mis en évidence une libération circadienne de 5-HT associée à des variations circadiennes des concentrations de protéine TPH dans les SCN, et l'existence de variations nyctémérales de TPH dans le RM.

Dans un premier temps, nous nous sommes interrogés sur la nature circadienne des variations de TPH mesurées dans les somas sérotoninergiques du RM et avons cherché à savoir si ces variations étaient également présentes en obscurité constante.

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris l'étude de la voie sérotoninergique afférente aux IGL et issue des somas situés dans le RD. En effet, cette voie est impliquée dans la synchronisation des fonctions rythmiques et intervient dans la modulation des signaux photiques et non photiques avant de les transmettre à l'horloge principale *via* le GHT. Nous avons voulu savoir si la synthèse de 5-HT dans cette voie montre une rythmicité circadienne

et pour cela nous avons quantifié les profils journaliers de la protéine TPH dans les IGL et le RD.

**Le deuxième objectif de ce travail était de vérifier si la rythmicité de synthèse de 5-HT peut se retrouver en amont de la protéine TPH, c'est à dire au niveau de l'expression du gène *tph2*.**

Les variations circadiennes des quantités de protéine TPH sont le reflet à chaque point horaire d'un équilibre dynamique entre sa synthèse et sa dégradation. La régulation de la synthèse de 5-HT met en jeu des mécanismes traductionnels mais aussi transcriptionnels, ces derniers permettant de modifier l'expression du gène codant la TPH. Dans les neurones sérotoninergiques du système nerveux central, c'est le gène *tph2* qui est impliqué dans la synthèse de 5-HT (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003). Grâce à des outils moléculaires spécifiques permettant la détection des transcrits de l'isoforme TPH2, nous avons quantifié l'expression du gène *tph2* sur un cycle nyctéméral et circadien et ceci dans chaque subdivision du RD et dans le RM.

**La nature circadienne de l'expression rythmique du gène *tph2* ayant été démontrée, le troisième objectif de la thèse a été de déterminer l'origine de cette rythmicité : endogène aux noyaux du Raphé ou générée par l'intermédiaire d'un message de l'horloge.**

Comme l'administration des glucocorticoïdes peut induire des modifications des quantités de protéine et d'ARNm TPH dans les noyaux du Raphé (Azmitia *et al.*, 1993 ; Clark & Russo, 1997 ; Clark *et al.*, 2005), nous nous sommes intéressés dans un premier temps au rôle joué par la corticostérone, une sortie endocrine rythmique de l'horloge. Pour étudier cela, nous avons mesuré les variations journalières de l'ARNm de la TPH2, dans différentes conditions expérimentales visant à modifier la sécrétion rythmique de corticostérone (surrénalectomie, implant de corticostérone et ajout de l'hormone dans l'eau de boisson).

Il est connu que le début de la période d'activité coïncide avec une augmentation de la fréquence de décharge des neurones sérotoninergiques (Trulson & Jacobs, 1979) associée à une induction de la libération de 5-HT dans plusieurs régions du cerveau (Kalén *et al.*, 1989 ; Ferraro & Steger, 1990 ; Barassin *et al.*, 2002 ; Grossman *et al.*, 2004). Une étude récente a également montré que l'induction de l'activité locomotrice par l'accès à une roue modifie l'expression de gènes spécifiques des neurones sérotoninergiques dans le RD et le RM (Greenwood *et al.*, 2005). Nous avons donc considéré, dans un deuxième temps, l'implication

de l'activité locomotrice, sortie comportementale de l'horloge et avons analysé son effet sur l'expression du gène *tph2* dans les deux noyaux du Raphé.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet de l'interaction entre le paramètre endocrine et le paramètre comportemental sur l'expression de l'ARNm de la TPH2.

**Enfin, dans la dernière partie, nous avons évalué l'effet des variations de la photopériode (durée relative de la phase lumineuse sur 24 h), sur les profils d'expression du gène *tph2*.**

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les variations photopériodiques pourraient moduler l'expression du gène *tph2*, notamment *via* une action de la corticostérone, dont la sécrétion varie en fonction de la durée de photopériode (Ahlersova *et al.*, 1992 ; Tritschler *et al.*, travaux non publiés).

L'ensemble de ces travaux est présenté sous forme de chapitres correspondants aux questions posées et chacun représente un article publié (chapitres I et II), soumis (chapitre III) ou en préparation (chapitre IV). Chaque chapitre est précédé de l'exposé de la problématique ayant initiée le travail.



## **RESULTATS**





**Chapitre I : Profils journaliers des  
concentrations de protéine tryptophane hydroxylase  
dans les neurones sérotoninergiques afférents au  
système circadien**



Chez le Rat, une libération circadienne de 5-HT dans les SCN a été mise en évidence (Barassin *et al.*, 2002). Cette libération, caractérisée par un pic situé en début de nuit (ZT13), est corrélée avec une synthèse circadienne de 5-HT dans les SCN. En effet, les concentrations de protéine TPH, index de la synthèse de 5-HT, varient sur une échelle de 24 h en LD mais aussi en obscurité constante dans les SCN (Figure 24-A et -B). L'évolution nycthémerale de ces concentrations montre deux pics situés avant les transitions jour/nuit et nuit/jour. Le pic le plus important en terme d'amplitude apparaît 2 à 3 heures avant celui de la libération de 5-HT dans les SCN, permettant ainsi d'établir une relation temporelle entre ces deux paramètres. La même étude a mis en évidence une variation nycthémerale des concentrations de TPH dans le RM, noyau sérotoninergique innervant les SCN.

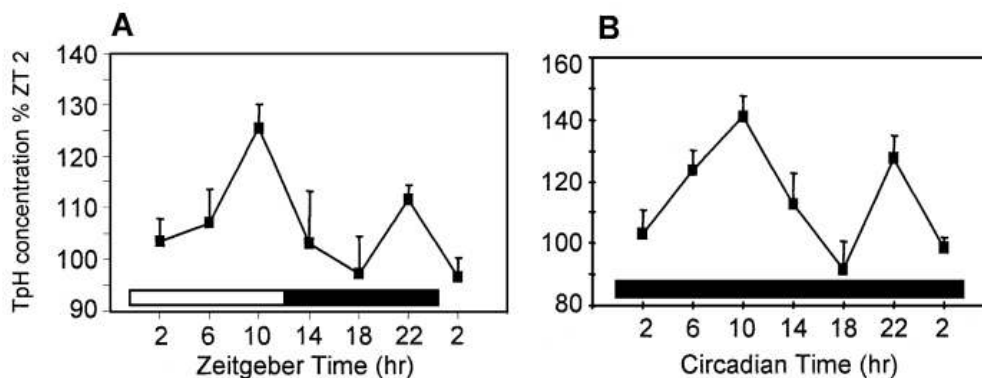


Figure 24 : Variations rythmiques des concentrations de protéine TPH dans les SCN en cycle LD (A) et en obscurité constante (B). D'après Barassin *et al.*, 2002

Deux questions émergent à l'issue de ces résultats : 1) les variations nycthémerales des concentrations de TPH dans le RM sont-elles endogènes ou bien contrôlées par l'alternance jour/nuit ? 2) Existe-t-il une synthèse rythmique de 5-HT dans la voie RD→IGL ?

**Dans ce chapitre, nous avons d'une part complété le travail de Barassin et collaborateurs (2002) pour déterminer si les variations de concentration de TPH dans le RM sont maintenues en obscurité constante. D'autre part, nous avons étudié l'évolution journalière des concentrations de TPH dans la voie RD→IGL. Ainsi, nous avons quantifié les concentrations de protéine TPH dans le RD, le RM et les IGL en cycle LD 12 :12 et en obscurité constante, par immunoautoradiographie. Cette technique permet de quantifier les concentrations de TPH avec une résolution anatomique tissulaire dans les différentes subdivisions des noyaux du Raphé et leurs aires de projections (Weissmann *et al.*, 1987 ; Raison *et al.*, 1995 ; 1996).**



# **Circadian change in Tryptophan Hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei**

**Zeina S. MALEK, Paul PEVET and Sylvie RAISON**

**Neuroscience, 2004 :125(3) : 749-758**

## ***Abstract***

Serotonin (5-HT) is involved in the synchronisation of the mammalian circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN). This clock is synchronised by light (photic cues) and by non-photic cues. Non-photic cues are notably conveyed to the SCN by a direct 5-HT pathway arising from the mesencephalic median raphe nucleus (MRN). Furthermore, an indirect projection conveys non-photic inputs by 5-HT fibres from the mesencephalic dorsal raphe nucleus (DRN) to the intergeniculate leaflets of the thalamus (IGL) which project to the SCN. In the rat, the quantitative distribution of tryptophan hydroxylase (TPH), used as an index of 5-HT synthesis, was studied by *in situ* immunohistochemistry in both the serotonergic cell bodies area of the raphe nuclei and the serotonergic terminal field of the IGL. Under a 12 h light: 12 h dark (LD12:12), TPH protein amount exhibited a rhythmic variation within the IGL. The maximum levels were reached at the day/night transition. In both MRN and the lateral groups of the DRN, TPH variations were opposite to those observed in the IGL. Such phase opposition was reported previously in the MRN/SCN pathway and was correlated with a rhythmic release of 5-HT within the SCN [Eur J Neurosci 15 (2002) 833]. Thus, the daily rhythmicity of TPH levels observed in DRN-IGL pathway may be correlated with a rhythmic release of 5-HT in the IGL at the beginning of the night. Under constant darkness, TPH rhythmic variations in the two serotonergic pathways were maintained and similar to those observed under light/dark cycle. These results demonstrate the existence of a circadian endogenous functioning in the 5-HT neurones projecting to the rat circadian system.

## ***Introduction***

Pacemakers are important in providing temporal information to the organisms in order to synchronise their physiological and behavioural functions and to anticipate the changes in their environment. In mammals, the generation of daily rhythms is controlled by the biological clock located in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN; Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972). This clock can be synchronised by both photic and non-photoc cues. Light, which is the major synchroniser (zeitgeber), is received by the retinal ganglion cells and transmitted directly to the SCN through the retinohypothalamic tract (RHT; Moore and Eichler, 1972). In addition, an indirect retinal input, arising from collateral of those ganglion cells, is conveyed to the SCN via the thalamic intergeniculate leaflets (IGL) of the lateral geniculate complex. In the rat, neuropeptide Y (NPY) and GABA are colocalised in the IGL neurones which project to the SCN through the geniculohypothalamic tract (GHT; Card and Moore, 1989). Further major input to the SCN is provided by the serotonergic projections arising from the mesencephalic raphe nuclei (RN). In the rat, serotonergic fibres innervating the SCN mainly originate from the median raphe nucleus (MRN; Azmitia and Segal, 1978; Hay-Schmidt *et al.*, 2003) and secondly from the dorsal raphe nucleus (DRN; Kawano *et al.*, 1996). On the other hand, serotonergic input innervating the IGL arises from the DRN (Azmitia and Segal, 1978; Meyer-Bernstein and Morin, 1996).

The lateral geniculate complex consists of three major nuclei: the dorsolateral geniculate (DLG), the ventrolateral geniculate (VLG) and the IGL. The IGL were first described in the rat as a distinct thin lamination intercalated between the DLG and the VLG (Hickey and Spear, 1976). Since, other anatomical and functional considerations were developed in order to make a complete description of the IGL. These nuclei (1) receive a retinal input; (2) contain NPY immunoreactive (NPY-ir) neurones that project to the SCN; (3) project to the contralateral IGL with met-enkephalin (met-ENK) neurones; (4) receive several modulator inputs such as those arising from the SCN and the DRN (for details, see Card and Moore, 1989). Functionally, the IGL are considered as an integrative relay in the circadian system, which is implicated in the processing of both photic and non-photoc cues. The specific destruction of this structure blocks the synchronisation of body temperature and wheel running rhythms by daily hypocaloric feeding (Challet *et al.*, 1996), the phase shifting effect of 8-hydroxy-(dipropylamino)-tetraline (8-OH-DPAT; a selective serotonin [5-HT<sub>1A</sub>/7] agonist) on the locomotor activity (Schuhler *et al.*, 1999) and reduces the rate of reentrainment to a phase shift under light/dark cycle (Johnson *et al.*, 1989).

Abundant evidence implicates 5-HT as an inhibitory transmitter that modulates the responses of the circadian clock to light. For example, electrical stimulation of the RN, or application of 5-HT agonists, blocks the light-induced c-Fos expression in the SCN (Meyer-Bernstein and Morin, 1999; Selim *et al.*, 1993), and attenuates light-induced phase shift of circadian wheel running activity (Rea *et al.*, 1994). Serotonergic projections, to both SCN and IGL, are also implicated in the integration of non-photic cues. Neurotoxic destruction of 5-HT afferents to the SCN prevents the phase shifting effect of 8-OH-DPAT on the locomotor activity (Schuhler *et al.*, 1998). Electrical stimulation of the DRN at the mid subjective day induces phase advance of the circadian wheel running rhythm of hamsters housed under constant darkness (Glass *et al.*, 2000). Within the rat SCN, it has been demonstrated by Barassin *et al.* (2002) that the release of 5-HT is rhythmic and endogenous. This release was correlated with circadian variation of the intraneuronal levels of tryptophan hydroxylase protein (TPH; enzyme class 1.14.16.4) within the SCN. The nocturnal release of 5-HT within the SCN occurred 3 h after the peak of TPH protein in this nucleus. This temporal relationship suggests an enhancement of 5-HT synthesis late at the light/dark cycle before its release early in the dark phase. In hamsters, 5-HT release is also circadian and regulated by several pharmacological agents acting on 5-HT system (Dudley *et al.*, 1998). By quantifying the TPH protein, which is the rate-limiting enzyme for 5-HT biosynthesis (Lovenberg *et al.*, 1967; Jéquier *et al.*, 1969), we can evaluate the intraneuronal levels of 5-HT.

The aim of the present study is to report the daily and circadian profiles of TPH levels in the RN and the IGL, in order to understand the dynamism of the 5-HT synthesis in both serotonergic pathways afferent to the circadian system. TPH protein levels were quantified by using *in situ* immunautoradiography as previously reported (Weissmann *et al.*, 1990; Raison *et al.*, 1995; Raison *et al.*, 1996; Barassin *et al.*, 2002).

## ***Experimental procedures***

### ***Animals and tissues preparation***

Adult male rats (Wistar; Faculté de Médecine, Strasbourg, France) weighing 180–200 g were placed during 3 weeks under LD12:12. The time of lights-on was defined as Zeitgeber time 0 (ZT0), whereas the time of lights-off was defined as ZT12. Two days before kill date, one group of rats was placed in constant darkness (DD; red dim light <2 lux) whereas the



other group was maintained under LD12:12. Food and water were available *ad libitum* for both groups throughout the course of the study. All experiments were performed in accordance with NIH Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/6.9/EEC) and the French laws. Efforts were made to minimise the number of animals used and their suffering. Animals were killed by decapitation every 4 h at seven time points along 24 h (five animals per point, the first point at ZT2 for LD animals and at circadian time 2 (CT2) for animals in DD). Brains were quickly removed, frozen at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 min 30 in cold isopentane and then stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Serial transverse sections ( $20\text{ }\mu\text{m}$  thick) were cut within a cryostat (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) along the entire rostro-caudal extent of the IGL (interaural [IA]: from  $+5.2\text{ mm}$  to  $+3.8\text{ mm}$ ; Paxinos and Watson, 1982). We defined eight anatomical levels along the IGL, the distance between two anatomical levels was  $200\text{ }\mu\text{m}$ . At each anatomical level two adjacent sections were collected. The first section was transferred onto nitrocellulose filter (Millipore HAHY) and processed for TPH immunautoradiography, the nitrocellulose filters efficiently retain proteins contained in sections. The second section was collected on a gelatine-coated slide and used as histological reference after NPY immunohistochemistry. On the same brains, transverse sections ( $20\text{ }\mu\text{m}$  thick) were also cut along the rostral part of the RN (IA: from  $+1.9\text{ mm}$  to  $+0.9\text{ mm}$ ; Paxinos and Watson, 1982). As for the IGL, eight anatomical levels were chosen, which were separated by  $200\text{ }\mu\text{m}$  from each other. At each anatomical level one section was transferred onto nitrocellulose filter and processed for TPH immunautoradiography.

### ***TPH immunautoradiography***

Sections transferred onto nitrocellulose filters were used to quantify TPH protein by immunautoradiography as previously reported (Weissmann *et al.*, 1990; Raison *et al.*, 1995; Raison *et al.*, 1996; Barassin *et al.*, 2002). The efficiency of protein transfer onto nitrocellulose membrane was evaluated previously and the amount of recovery after such transfer is 75% of total brain proteins (Weissmann *et al.*, 1989). The transfers were incubated during 45 min in Tris-buffered saline solution (TBS; 50 mM, pH 7.4) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA; Roche, Mannheim, Germany; TBS-BSA 0.5%) in order to saturate non-specific binding sites. The transfers were then incubated overnight in a solution of TBS-BSA 1% containing TPH sheep polyclonal antiserum (gift from Pr. M. Maître, Faculté de Médecine, Strasbourg, France; Cash *et al.*, 1985) at 1:250. After three washes in TBS-BSA

0.5%, transfers were incubated during 2 h in TBS-BSA 1% containing [<sup>125</sup>I]-labelled protein G at 1:500 (NEN; SA 21  $\mu$ Ci/ $\mu$ g). After three successive rinses, 10 min each in TBS-BSA 0.5%, TBS 50 mM and TBS 500 mM, transfers were washed in distilled water, dried and then opposed against Kodak BioMax films. To allow quantification, standards were prepared as following: six solutions at decreasing concentrations of TPH prepared from rat DRN tissue homogenate (20% w/v), were diluted with increasing amounts of rat cerebellum tissue homogenate (20% w/v). One microlitre of each dilution was deposited onto nitrocellulose filters and processed together with the section transfers.

### ***NPY immunohistochemistry***

As IGL contain NPY-ir neurones and fibres, the immunohistochemical detection of NPY was used in our study as histological reference. Sections collected on gelatine-coated slides were post-fixed during 20 min with freshly prepared paraformaldehyde 4% solution in 0.1 M phosphate buffer. After rinses in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), sections were incubated overnight at 4 °C in PBS–Triton 0.5% solution containing primary NPY antiserum at 1:6000 (gift from Pr. R. Buijs, the Institute for Brain Research, Amsterdam, Netherlands; Buijs *et al.*, 1989). Thereafter, sections were washed three times 10 min each in PBS, and then incubated during 2 h at room temperature in PBS–Triton 0.5% solution with biotinylated secondary antiserum at 1:500 (goat anti-rabbit; Vector, Burlingame, USA) and 1% of goat normal serum. After three rinses in PBS, sections were incubated during 1 h in PBS–Triton 0.5% containing ABC reagent at 1:1000 (Elite Kit; Vector Laboratories). Peroxidase activity was detected by using 0.0125% diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, USA) in Tris 0.05 M (pH 7.6) containing 0.0075% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The revelation was done in darkness during 30 min and stopped by transferring sections in PBS. Sections were dried, dehydrated and coverslipped for microscopy analysis. Slides were examined with optical microscopy (Leica) and sections of each brain were ranked in order to determine the rostro-caudal limits and the boundaries of the IGL. By reference to these slides, immunautoradiographs were classified according to their position along the entire rostro-caudal extent of this nucleus.

### ***Data analysis***

Developed films were analysed by using a computer image analysis system (Biocom; RAG 2000). Optical density was measured for each selected area (IGL, MRN, DRN). Non specific signal was measured for each section and then subtracted from specific signal. By

reference to standards, optical density was converted to enzyme concentration per 20  $\mu\text{m}$  section expressed in arbitrary units of TPH per milligram of tissue (a.u.TPH/mg). One hundred units being defined as the amount of TPH in one DRN of control rat killed at ZT2. NPY immunohistochemistry was used to delineate the borders and the rostral and caudal limits of the IGL. By reference to this delineation, morphological boundaries of the IGL were drawn on transparent films and superimposed on the immunoautoradiographs during the analysis in order to quantify TPH only in the IGL. The anatomical resolution obtained after transferring sections onto nitrocellulose filters was used to delineate the morphological borders of the RN. Along the rostral part of these nuclei, we distinguished the DRN in which several subdivisions were observed: ventromedian (VM), dorsomedian (DM), and two lateral groups (LAT). Ventrally to the DRN, the MRN is defined. Thereafter, sections on immunoautoradiographs were ranked in order to determine corresponding anatomical levels in each series of sections and in all brains.

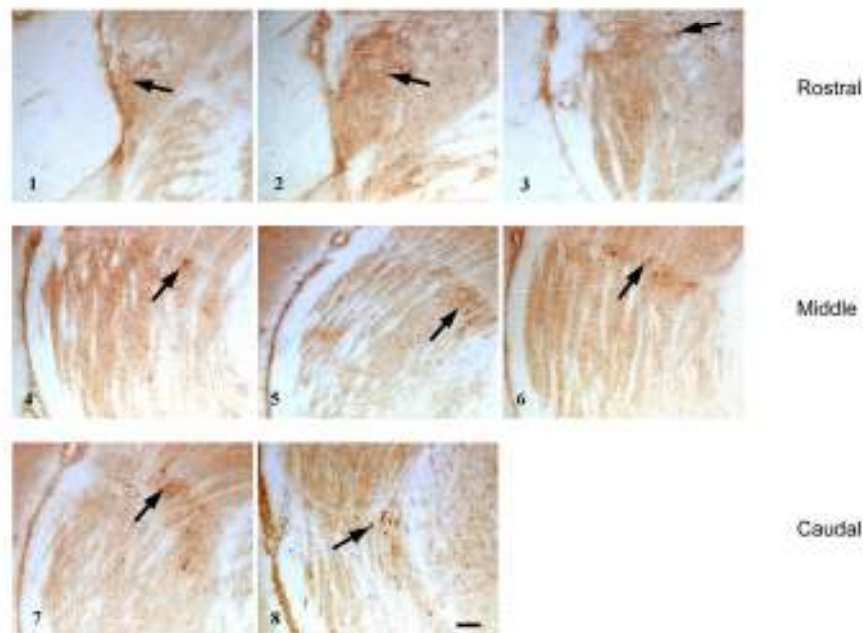
### *Statistics*

In the IGL, a one-way analysis of variance (ANOVA I) was performed in order to demonstrate the rhythmic distribution of TPH labelling during 24 h, the tested factor was the effect of ZT for LD condition and CT for DD condition. The distribution of TPH labelling between two time points in the RN was assessed under LD and DD conditions by using an ANOVA I test, the tested factor being the kill time effect between two points. In both IGL and RN, a two-way ANOVA (ANOVA II) was performed to test the anatomical distribution of TPH labelling and the kill time effect between two points under both LD and DD conditions.

## ***Results***

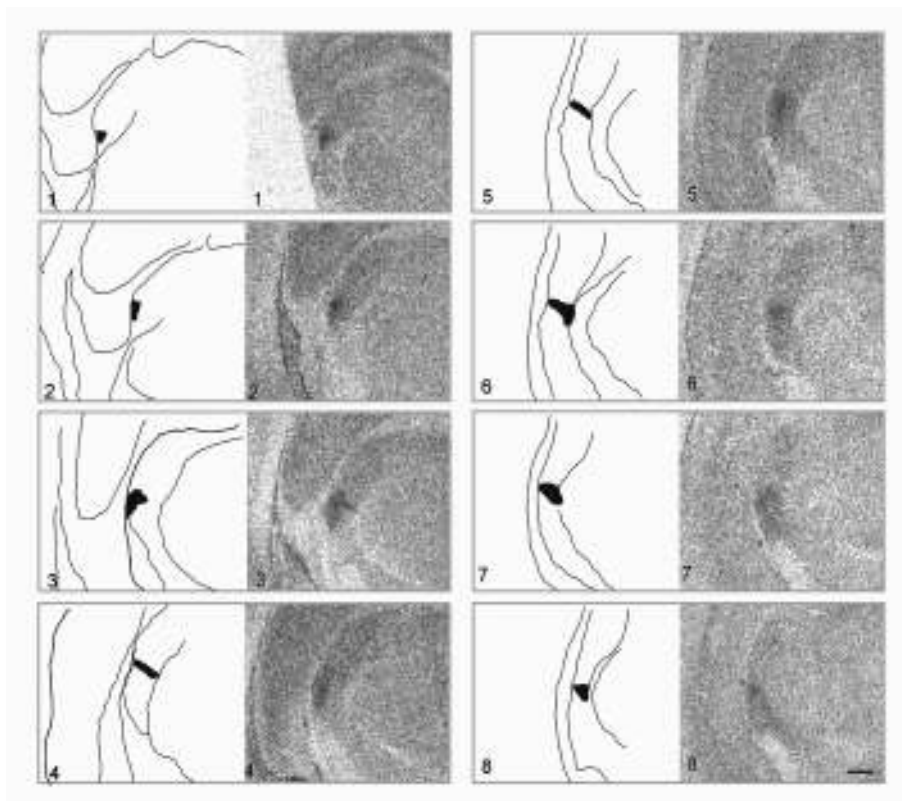
### ***Morphological delineation of the IGL***

By using immunohistochemistry detection, the distribution of NPY-ir was studied along the rostro-caudal axis of the IGL in order to delineate the borders and the rostral and caudal extents of this nucleus which are the most troublesome areas in this delineation. As shown in Fig. 1 the IGL consist of a thin layer of neurones that starts in a sagittal plan at the most rostral part of the geniculate complex (levels 1, 2 and 3 on Fig. 1), then extents as an horizontal lamina between the DLG and the VLG (levels 4, 5 and 6) and finally turns to lie between the VLG and the medial geniculate (levels 7 and 8). Only at the middle levels, the IGL are truly in their laminar leaflet configuration. By reference to this histological delineation, IGL borders were defined and TPH immunoautoradiographs of the adjacent sections were ranked in order to determine corresponding anatomical levels in each series of sections and in all brains (Fig. 1 and Fig. 2).



---

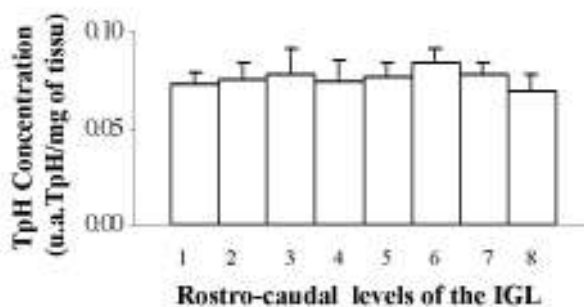
*Fig. 1. NPY immunolabelling along the rostrocaudal axis of the IGL. The eight anatomical levels considered in the IGL are represented with the respect to the morphological delineation of this structure. Each level represents a 20  $\mu\text{m}$  thick coronal section and the interval between two levels is 200  $\mu\text{m}$ . Scale BAR=75  $\mu\text{m}$ .*



*Fig. 2. By using NPY immunolabelling as an histological reference, the IGL are filled in with black at each plan (left) and the schema are superimposed on the appropriate TPH immunautoradiograph (right). The eight anatomical levels considered on immunautoradiographs are adjacent to those in Fig. 1 and represent the transfer of a 20  $\mu\text{m}$  thick coronal section onto nitrocellulose filters. The interval between two levels is 200  $\mu\text{m}$ . Scale BAR=400  $\mu\text{m}$ .*

### ***TPH quantification in the IGL***

The TPH labelling represented in Fig. 2, was visualised along 1600  $\mu\text{m}$  of the IGL in which eight anatomical levels were considered. The quantitative analysis of TPH mean concentration along the entire axis of the IGL of a rat killed at ZT2 displayed an homogeneous rostro-caudal distribution (Fig. 3).



*Fig. 3. Anatomical distribution of TPH concentration along the rostrocaudal extent of the IGL of five rats placed in LD 12:12 and killed at ZT 2. Are represented means  $\pm$  S.E.M. of TPH concentration on 20  $\mu\text{m}$  sections. The anatomical levels 1–8 are those illustrated on Fig.2. By using ANOVA 1 analysis, no significant variation in the anatomical distribution of TPH concentration was observed.*

Daily profiles of TPH amount were quantified every 4 h at each of the eight anatomical levels of the IGL. Overall the entire rostro-caudal axis of the IGL, TPH amount displayed a significant rhythmic variation under LD condition (Fig. 4-A,  $P < 0.001$ ). TPH mean concentration increased during the light period to reach its maximum values at the day–night transition (ZT2 vs ZT10: +50%,  $P < 0.05$ ). During the dark period, TPH mean concentration in the IGL decreased progressively to return to the basal values at ZT2. In order to verify if TPH rhythmic variation in the IGL is regionally arranged, we compared TPH amount at each considered anatomical level of the IGL. We found that TPH mean concentration increased significantly ( $P < 0.05$ ) between ZT2 and ZT10 at all the anatomical levels considered along the axis of this nucleus (Fig. 4B). When rats were maintained under DD condition, daily profile of TPH amount was not different from that observed under LD condition: TPH mean concentration increased significantly ( $P < 0.05$ ) during the subjective day (between CT2 and CT10: +54%) at all the anatomical levels of the IGL (Fig. 4D). At CT12, TPH mean levels were maximal and decreased progressively during the subjective

night to return to the basal levels at CT2. As presented in Fig. 4C, TPH values under DD condition exhibited a significant circadian variation with a period of 24 h ( $P<0.001$ ).

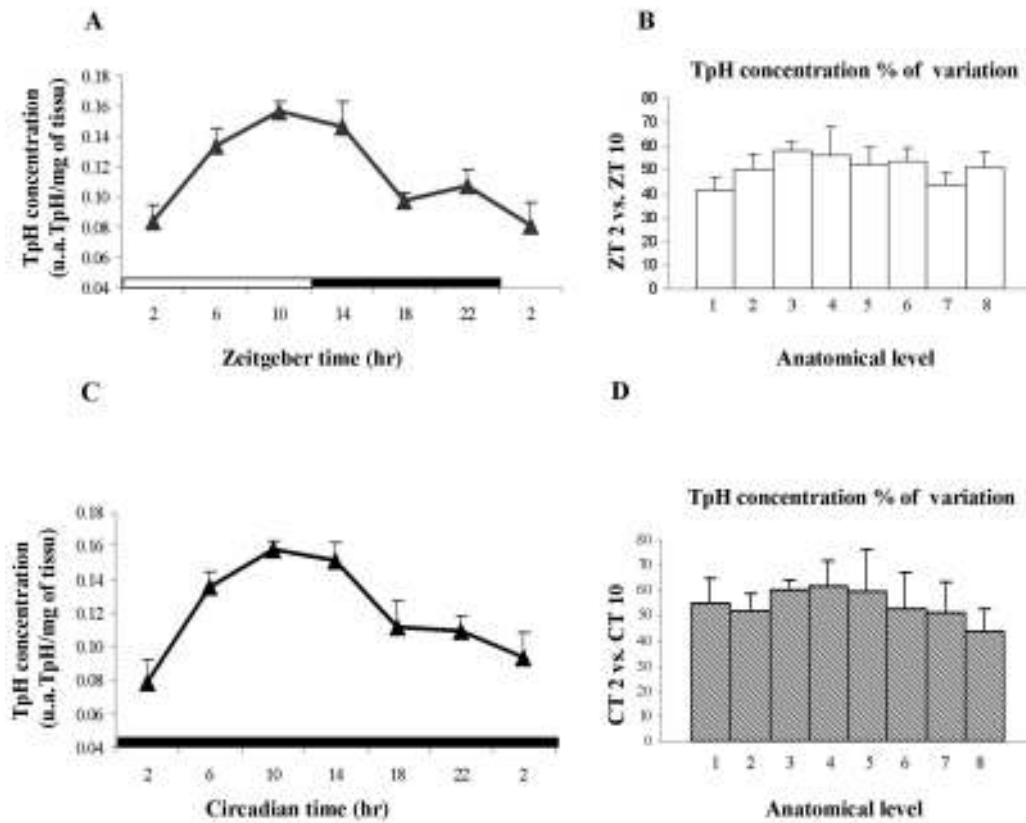
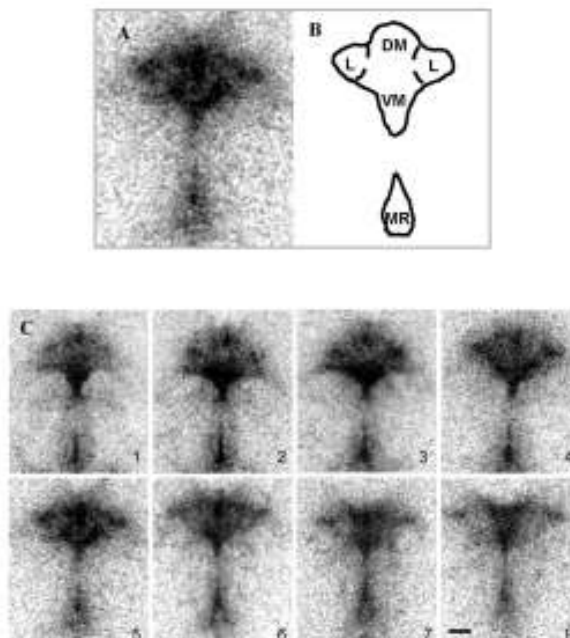


Fig. 4. Daily profiles of TPH mean concentration in the IGL of rats maintained either under LD 12:12 (A) or under DD (C). Each symbol represents the means $\pm$ S.E.M. of TPH concentration for the eight anatomical levels along the IGL for five rats. Horizontal white bar: light period, horizontal black bar: dark period. By ANOVA I analysis,  $P<0.001$  for the ZT and CT effect. Rostrocaudal distribution of TpH relative variation $\pm$ S.E.M. in the IGL is represented in B between ZT2 and ZT10, and in D between CT2 and CT10. By ANOVA II analysis,  $P<0.05$  for the time effect. No significant variation was observed for the anatomical distribution effect.

### ***TPH quantification in the RN***

The anatomical resolution obtained after transferring sections onto nitrocellulose filters allowed a precise quantification of TPH at the tissue level. By using this fine anatomical technique, the different subdivisions of the DRN, as well as the rostro-caudal limits of both DRN and MRN, were clearly delineated along the rostral part of the RN. The daily profile of TPH amount was quantified every 4 h along 1600  $\mu\text{m}$  of the RN under LD12:12 and DD conditions. At each anatomical level, the different subdivisions of the DRN were defined: LAT, DM and VM subdivisions, ventrally to the DRN, the MRN was observed (Fig. 5A and B). Fig. 5C represents the TPH labelling obtained on the eight anatomical levels considered in the RN.



*Fig. 5. The TPH immunolabelling in the RN (A). As drawn in B, the DRN is subdivided into Lat groups (L), VM and DM, with the MRN located ventrally to the DRN. Immunoautoradiographs of TPH labelling on the eight anatomical levels considered along the rostral part of the RN are represented in C. Each level represents the transfer of a 20  $\mu\text{m}$  thick coronal section onto nitrocellulose filters and the interval between two levels is 200  $\mu\text{m}$ . Scale BAR=150  $\mu\text{m}$ .*

When quantified as a whole nucleus, the DRN did not exhibit any significant variation in TPH mean concentration (data not shown). Thereafter, the different subdivisions of the DRN were analysed and quantified separately. In the VM and DM subdivisions, no significant



variations of TPH amount were observed in any of the eight anatomical levels neither under LD nor under DD conditions (data not shown). However, in the DRNLAT, TPH amount displayed a daily rhythmic variation under LD condition: a significant increase was observed between ZT10 and ZT18 and the maximum values were reached at ZT18 (Fig. 6A, +25%,  $P<0.05$ ). When TPH labelling was followed at each anatomical level of the LAT groups between ZT10 and ZT18: TPH mean concentration significantly increased at each of the eight anatomical levels considered of the DRNLAT between those two time points (Fig. 6B;  $P<0.001$ ). Similarly, TPH amount in the MRN under LD cycle varied significantly over 24 h. TPH mean concentration increased significantly between ZT10 and ZT18 with a peak at ZT18 (Fig. 6C; +30%,  $P<0.05$ ). Furthermore, as shown in Fig. 6D, this increase was significant at each of the eight anatomical levels of the MRN ( $P<0.001$ ).

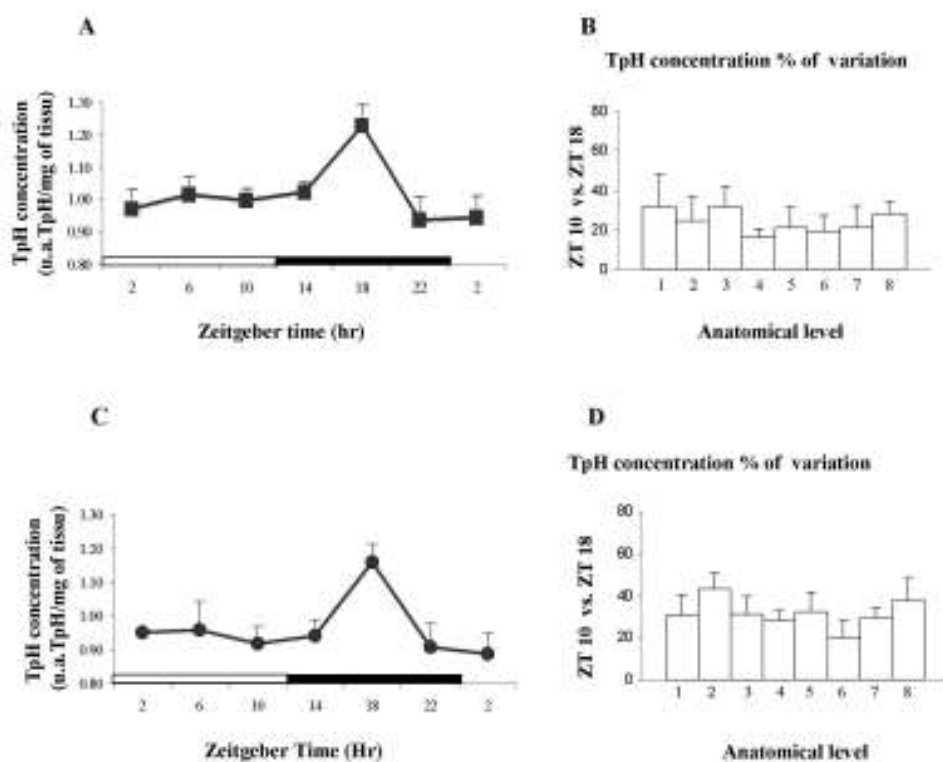


Fig. 6. Daily profiles of TPH mean concentration in the DRNLat (A) and the MRN (C) of rats maintained under LD 12:12 cycle. The symbols represent the means  $\pm$  S.E.M. of TPH concentration measured along the considered anatomical levels in both nuclei for five rats. Horizontal white bar: light period, horizontal black bar: dark period. In B and D are represented the rostrocaudal distributions of TPH relative variation  $\pm$  S.E.M. in DRNLat and MRN between ZT10 and ZT18. By ANOVA II analysis,  $P<0.001$  for the time effect. No significant variation was observed for the anatomical distribution effect.

When animals were maintained under DD condition, TPH variation reported in the DRNLAT (Fig. 7A) was similar to that observed in animals placed under LD condition. As represented in Fig. 7B, at all the anatomical levels, TPH mean concentration exhibited a significant circadian variation ( $P<0.001$ ) with maximum levels at CT18 (+27%,  $P<0.05$ ). TPH variation in the MRN under DD conditions was also circadian ( $P<0.05$ , Fig. 7C), the maximum levels were observed at CT18 (+25%) at all the considered anatomical levels in this nucleus (Fig. 7D;  $P<0.05$ ).

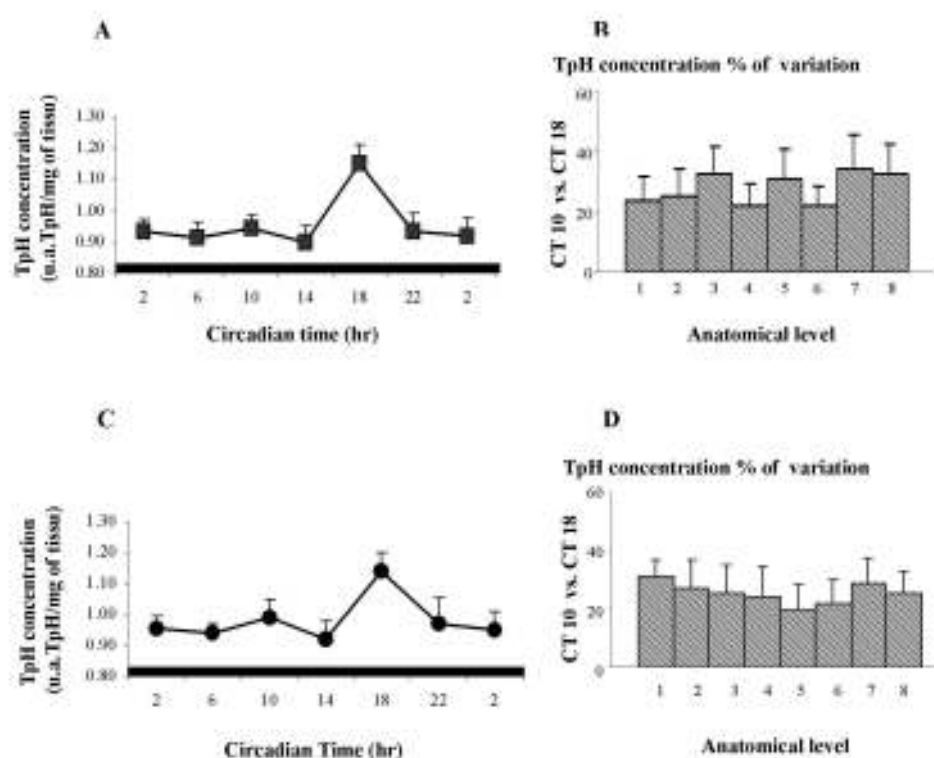


Fig. 7. Daily profiles of TPH mean concentration in the DRNLat (A) and the MRN (C) of rats maintained under DD condition. The symbols represent the means $\pm$ S.E.M. of TPH concentration measured along the anatomical levels considered in both nuclei for five rats. Horizontal white bar: light period, horizontal black bar: dark period. The rostrocaudal distribution of TPH relative variation $\pm$ S.E.M. is represented in B for DRNLat and D for MRN between CT10 and CT18. By ANOVA II analysis,  $P<0.001$  for the time effect. No significant variation was observed for the anatomical distribution effect.

## ***Discussion***

5-HT is involved in both photic and non-photoc synchronisation of the mammalian master clock located within the hypothalamic SCN. Pickard et al. (1999) have shown that 5-HT modulates the photic input to the SCN by inhibiting the release of glutamate from the RHT terminals. Furthermore, 5-HT and 5-HT<sub>1A</sub> agonists have been found to alter the photic response of both IGL and SCN neurones (Ying and Rusak, 1994; Ying *et al.*, 1993). On the other hand, 5-HT transmits non-photoc cues via both DRN/IGL and MRN/SCN pathways (Schuhler *et al.*, 1998; Schuhler *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2000). 5-HT release within the rat SCN is circadian and correlated with its circadian synthesis in this serotonergic terminal field (Barassin *et al.*, 2002). However, the mechanisms underlying this rhythmic pattern remain unstudied for the DRN/IGL pathway and they are incomplete for the MRN/SCN pathway. The aim of the present study is to determine the daily and the circadian profiles of TPH protein amount in order to evaluate the intraneuronal levels of 5-HT in these pathways.

### ***Morphological boundaries of the IGL***

The IGL per se were described initially by Hickey and Spear (1976) followed by several anatomical studies, which completed their description. This structure contains NPY-ir neurones and fibres, as well as met-ENK- and GABA-ir neurones (Moore and Card, 1994). In rats, NPY-ir neurones project to the SCN *via* the GHT, whereas ENK-ir neurones project mainly to the controlateral IGL (Card and Moore, 1989). In our study, we used NPY immunodetection to delineate the morphological boundaries of the IGL in order to quantify precisely TPH protein content only in this nucleus. These nuclei consist of three morphologically distinguishable parts: 1) a rostral part, where the IGL lie at the lateral borders of the lateral geniculate complex; 2) a middle part, where IGL present a laminar configuration intercalated between the DLG and the VLG; 3) a caudal part, where the IGL present a triangular configuration between the VLG and the medial geniculate.

### ***TPH variations under LD12:12 conditions***

As TPH is the rate-limiting enzyme in the 5-HT biosynthesis, the intraneuronal amount of this protein, as well as its activity, determine the level of 5-HT synthesised in the serotonergic neurones (Lovenberg *et al.*, 1967; Jéquier *et al.*, 1969). In the central nervous system, TPH protein is synthesised specifically within the serotonergic soma of the

mesencephalic RN neurones and then transported to the terminal fields with a slow rate of axonal flow (Meek and Neff, 1972). The TPH levels within the IGL serotonergic terminals were quantified by *in situ* immunautoradiography. This quantitative detection demonstrates that the distribution of TPH mean concentration is homogenous throughout the entire rostrocaudal axis of this nucleus, suggesting that the serotonergic input is similar at each of the eight anatomical levels considered. Under a 24 h LD cycle, TPH protein amount exhibited rhythmic variation within the IGL. To precisely define the origin of this variation, we quantified TPH amount in the RN. Only the DRNLAT exhibited rhythmic variation in their TPH content under a 24 h LD cycle. These results suggest that 5-HT neurones projecting to the IGL might be located in the DRNLAT as previously described by tracing studies (Moga and Moore, 1997; Villar *et al.*, 1988; Pasquier and Villar, 1982). But we cannot exclude that a part of the serotonergic input to the SCN might originate from the neurones of the DRNLAT (Kawano *et al.*, 1996). TPH protein levels quantified in the MRN were also rhythmic, a result in accordance with previous data from our laboratory: TPH protein showed increasing levels between ZT10 and ZT18 (Barassin *et al.*, 2002).

The rhythmic variation of TPH protein amount measured within the RN is correlated with rhythmic variation of TPH enzyme activity with a maximum at the end and/or at the second part of the dark period for MRN and DRN respectively (Kan *et al.*, 1977; Poncet *et al.*, 1993). The similar variations in TPH activity and protein levels indicate that our method detects the active form of the enzyme and thereby reflects the amount of the 5-HT synthesised in these neurones. The temporal distribution of TPH protein variation in the IGL is opposite to that reported in the DRNLAT. Similar phase opposition is observed in the MRN-SCN pathway (the present study, Barassin *et al.*, 2002). Such phase opposition was already reported (Kan *et al.*, 1977) between the DRN and striatum (a terminal field that receives 5-HT projections from DRN). This phase opposition in DRNLAT-IGL (as in MRN-SCN), could result from the time required for TPH protein synthesised in the cell body areas to be transported to the nerve endings areas. Such time delay is consistent with the rate of axonal transport of TPH protein calculated from the reappearance of TPH activity after treatment with an inhibitor of TPH activity (Meek and Neff, 1972). Being of the order of 5–7 mm/day, this rate is characteristic of the slow axonal flow. All these data suggest the presence of a temporal relationship between the maximal levels of TPH in the 5-HT cell bodies and the nerve terminals areas: TPH synthesised in the RN is transported during the day to the 5-HT terminal fields (IGL and SCN) in which 5-HT is synthesised before the onset of the darkness

and released at the beginning of the night as shown in the SCN (Barassin *et al.*, 2002). Thus, we can suggest that TPH protein variation observed in the DRNLAT-IGL pathway could be correlated with a rhythmic release of 5-HT within the IGL at the beginning of the night, i.e. 3 h after the maximal TPH levels measured in these nuclei.

### ***TPH variations under DD conditions***

When rats were maintained under DD, TPH variation in the IGL was similar to that observed under LD cycle. This result suggests that TPH protein amount in the 5-HT terminal area of the IGL is independent of the light/dark cycle and consequently is under SCN control. This control could be either at the level of the IGL *via* the SCN-IGL pathway (Card and Moore, 1989), or at the level of the RN themselves. To clarify this point, we quantified the TPH protein amount in the RN under DD conditions. The profile of TPH variation observed under LD condition was maintained under DD condition in both DRNLAT and MRN, suggesting an endogenous regulation of the 5-HT synthesis in these nuclei.

Our results suggest that 5-HT synthesis is regulated endogenously at the level of the RN projecting to both IGL and SCN. We can suggest that SCN convey either directly or indirectly a synchronising input to the DRNLAT and the MRN. Direct neuronal pathway connecting the SCN to the RN has not yet been described, but the presence of multineuronal pathway is conceivable. SCN control could be conveyed to the RN *via* endocrine pathways. Corticoids might be potent messengers in conveying such input: glucocorticoids modulate 5-HT synthesis by acting on both TPH protein amount and activity (Azmitia *et al.*, 1993; Clark and Russo, 1997) and corticosterone inhibits the negative control of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors on the DRN neurones activity (Laaris *et al.*, 1995). Melatonin, which is synthesised under the SCN control, might also be involved and this hormone is known to modulate the 5-HT synthesis in SCN (Miguez *et al.*, 1996). The SCN rhythmic message could be also conveyed by behavioural cues. The existence of a relationship between the serotonergic system and locomotor activity has been demonstrated: the firing rate of 5-HT neurones changes dramatically through the sleep–wake–arousal cycle, which could be correlated with changes at the level of the locomotor activity that accompany those behavioural states (Jacobs and Fornal, 1997). Furthermore, induced locomotor activity influences in a phase dependant manner the release of 5-HT within the SCN (Dudley *et al.*, 1998). Circadian locomotor activity might thus drive the RN rhythmicity and would determine the circadian pattern of 5-HT synthesis. The presence of an oscillator within the RN might explain the 5-HT rhythmic

synthesis. The absence of clock genes expression in the RN (Shieh, 2003) does not support this hypothesis. However, in this study, rats were killed at ZT4–ZT6, which might not be in phase with a putative expression of these genes. Further experiences are needed to reach a conclusion.

In conclusion, our results demonstrate a rhythmic functioning of the serotonergic neurones projecting to the rat circadian system. This rhythmic functioning in both DRNLAT and MRN could be controlled, either directly or indirectly, by the SCN (neuronal, endocrine or behavioural pathways), or could originate from oscillator located in the RN themselves. On the other hand, TPH amount circadian variations in DRNLAT-IGL pathway might be correlated with a circadian release of 5-HT within the IGL.

### ***Acknowledgements***

The authors wish to thank Prs. M. Maître and R. Buijs for providing TPH and NPY antisera, D. Bonn and A. Sener for taking care of the animals and D. Hazlerigg and V. Laurent-Gydé for English revision.



**Chapitre II : Étude de l'expression journalière du  
gène *tryptophane hydroxylase-2* dans le Raphé  
médian et dorsal chez le Rat**





L'existence de variations circadiennes des concentrations de protéine TPH dans les noyaux du Raphé soulève la question suivante : À quel niveau ce message circadien est-il transmis ? Des régulations post-traductionnelles et/ou des mécanismes de dégradation protéique pourraient être à l'origine de cette rythmicité. Par ailleurs, l'existence d'une régulation, à l'échelle circadienne, de la transcription du gène codant la TPH est également envisageable. Afin d'examiner cette dernière éventualité, nous avons quantifié les niveaux d'ARNm de la TPH dans le RM et toutes les subdivisions du RD par hybridation *in situ*.

Avant d'entreprendre cette étude, l'élaboration d'outils moléculaires spécifiques ainsi que leur validation technique étaient nécessaires. En effet, avant la découverte du gène *tph2* en 2003, seules des sondes élaborées à partir de la séquence déjà connue du gène *tph* de la glande pinéale étaient disponibles. Ainsi, nous avons développé des sondes ribonucléotidiques à partir de cette séquence et avons mis en évidence un signal très faible dans les noyaux du Raphé mais particulièrement intense dans la glande pinéale (Figure 25-A). Des niveaux d'expression faibles de l'ARNm de la TPH dans les noyaux du Raphé avaient déjà été décrits dans la littérature (Figure 25-B ; Kim *et al.*, 1991 ; Dumas *et al.*, 1989).

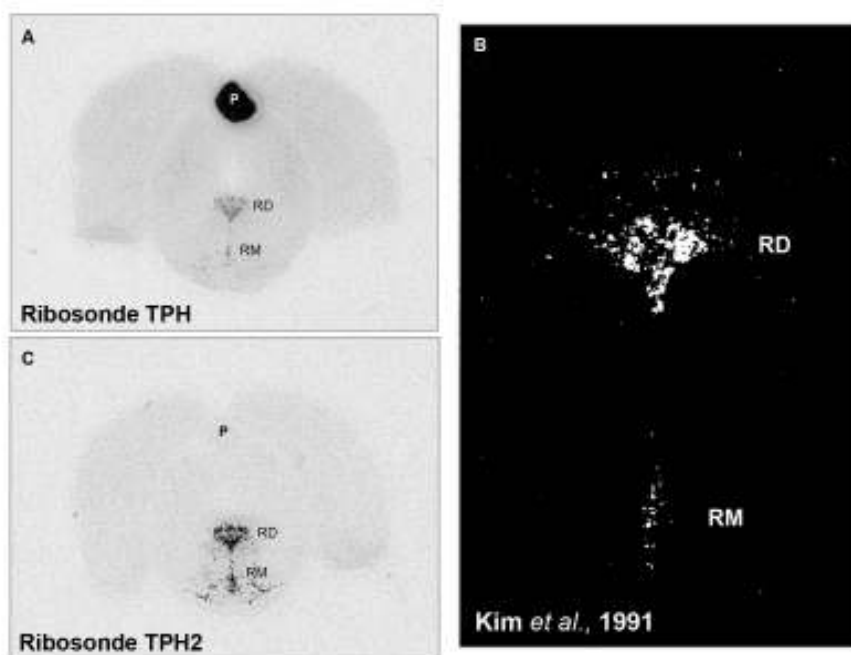


Figure 25 : Expression de l'ARNm de la TPH détectée par hybridation *in situ* dans les noyaux du Raphé et la glande pinéale (A et B). L'ARNm de la TPH2 est exprimé exclusivement dans les Raphés (C).

L'étude des Souris dépourvues du gène *tph* a permis de mettre en évidence le gène *tph2*, impliqué dans le contrôle de la synthèse de 5-HT dans les neurones sérotoninergiques (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003). Le gène *tph*, nommé *tph1*, intervient dans la synthèse de 5-HT dans la pinéale, les mastocytes et le système nerveux périphérique.

Nous avons donc élaboré une sonde ribonucléotidique spécifique des ARNm TPH2 (Figure 25-C) et avons démontré que le gène *tph2* est exclusivement exprimé dans les noyaux du Raphé, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes (Côté *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2003). Le pourcentage important d'homologie entre les séquences codantes des deux gènes *tph* expliquerait alors le signal détecté dans le Raphé avec la sonde élaborée à partir de la séquence du gène *tph1* (Figure 25-A). Afin de confirmer cette expression spécifique aux deux tissus, nous avons utilisé des sondes oligonucléotidiques élaborées à partir de la séquence codante la région N-terminale de la TPH1 et la TPH2. En effet, la séquence de cette région diffère entre les deux isoformes TPH. Grâce à cette approche, nous avons confirmé que l'expression du gène *tph2* est exclusive aux noyaux du Raphé. En utilisant la sonde oligonucléotidique TPH1, aucun signal n'est détecté dans le Raphé contrairement à la pinéale, où l'expression de l'ARNm de la TPH1 est particulièrement importante.

**Dans ce chapitre, nous avons quantifié les niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 par hybridation *in situ* dans le RM et l'ensemble des subdivisions du RD chez des Rats placés en cycle LD12 :12 et en obscurité constante.**

# Tissue-specific expression of Tryptophan Hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles

Zeina S. MALEK, Hugues DARDENTE, Paul PEVET and Sylvie RAISON

European Journal of Neuroscience, 2005 : 22(4) : 895-901

## *Abstract*

Serotonin (5-HT) is involved in both photic and non-photoc synchronization of the mammalian biological clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN). We have previously demonstrated that tryptophan hydroxylase protein (TPH), the rate-limiting enzyme of 5-HT synthesis, shows circadian rhythmicity in the pathways projecting from the raphe nuclei to the intergeniculate leaflets of the thalamus on one hand, and to the SCN on the other hand. In this study, we investigate whether the circadian rhythmicity in TPH protein could result from the rhythmic expression of *tph* gene in the raphe nuclei. We thus cloned specific *tph1* and *tph2* partial cDNAs and assessed the daily profiles of TPH mRNA levels by *in situ* hybridization in the rat raphe nuclei.

Our results demonstrate that: (i) *tph2* gene is exclusively expressed in the raphe nuclei, whereas *tph1* gene is expressed in the pineal gland; (ii) under light-dark cycle (LD), TPH2 mRNA levels present daily variation within both median and dorsal raphe nuclei; (iii) under constant darkness TPH2 mRNA levels in both nuclei exhibit the same variation reported under LD cycle. These data show that the circadian 5-HT synthesis within the serotonergic neurons projecting to the circadian system might be explained by the rhythmic transcription of the *tph2* gene in raphe nuclei. Taking our result with previous data into consideration, we further suggest that 5-HT synthesis and release within the circadian system could be directly or indirectly under the control of the SCN.

## ***Introduction***

In mammal's central nervous system (CNS), tryptophan hydroxylase (TPH, EC 1.14.16.4) is the first and limiting enzyme in the biosynthesis pathway of serotonin (5-HT, Lovenberg *et al.*, 1967; Jequier *et al.*, 1969). TPH is expressed in the serotonergic neurons of the raphe nuclei (RN, Weissmann *et al.*, 1987) and thereby considered as a marker of 5-HT synthesis as its amount and activity reflect the intraneuronal levels of the neurotransmitter. Among the numerous physiological functions influenced by 5-HT (as thermoregulation, feeding, sleep-wake cycle or learning, for revue see Lucki, 1998), this neurotransmitter is involved in the control of circadian rhythmicity (Morin, 1999; Sanggaard *et al.*, 2003; Yannielli & Harrington, 2004).

Biological rhythms are generated by the endogenous pacemaker located within the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN, Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972; Ralph *et al.*, 1990). The serotonergic input to the circadian system originates from two distinct serotonergic pathways. The first, arising from median raphe (MR), projects to the SCN (Azmitia & Segal, 1978; Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Hay-Schmidt *et al.*, 2003); while the second, arising from dorsal raphe (DR), innervates the thalamic intergeniculate leaflets (IGL, Azmitia & Segal, 1978; Meyer-Bernstein & Morin, 1996) that project to the SCN (Card & Moore, 1989). Several studies have investigated the involvement of 5-HT in both photic and non-photic synchronization of the circadian system. Serotonergic agonists can attenuate the light-induced c-fos expression within the SCN (Glass *et al.*, 1994; Rea *et al.*, 1994) and reduce the release of glutamate by acting on retinal terminals (Pickard *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000). Serotonergic input to the SCN is also implicated in the synchronizing effect of timed caloric restriction (Challet *et al.*, 1997a), and 5-HT antagonists impair the phase-advancing effect of arousal (Sumova *et al.*, 1996). Furthermore, electrical stimulation of the DR at the mid subjective day induces phase advance of the circadian wheel running rhythm of hamsters housed under constant darkness (Glass *et al.*, 2000).

Despite the well-studied roles of 5-HT, little is known about the functioning of serotonergic neurons in the circadian system. In previous studies, we have demonstrated that TPH protein levels are circadian within DR, MR, SCN and IGL of rat (Barassin *et al.*, 2002; Malek *et al.*, 2004). Furthermore, the circadian profiles of TPH protein levels are correlated with rhythmic variations of TPH enzyme activity measured in raphe (Kan *et al.*, 1977; Poncet *et al.*, 1993), and with rhythmic release of 5-HT within SCN and IGL measured by *in vivo* microdialysis (Dudley *et al.*, 1998; Barassin *et al.*, 2002; Grossman *et al.*, 2004). Earlier

studies have also investigated the rhythmic release of 5-HIAA (the principal metabolite of 5-HT) within the SCN using voltametric measurements or push-pull technique (Faradji *et al.*, 1983; Ramirez *et al.*, 1987). However, nothing is known about the daily profiles of TPH mRNA expression in DR and MR. Dumas *et al.* (1989) have reported very low levels of TPH mRNA expression within the DR in comparison to the pineal gland, where TPH enzyme is also present as a non-limiting enzyme. Recently, a second gene encoding another TPH was cloned (named *tph2*, or neuronal *tph*) and shown to be expressed in the CNS, whereas *tph1* is expressed exclusively in the periphery including the pineal gland (Cote *et al.*, 2003; Walther & Bader, 2003; Walther *et al.*, 2003). At the same time, a recent report from Sugden (2003) demonstrates the presence of both TPH1 and TPH2 mRNAs in the pineal gland using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. All these data prompted us to carefully reconsider the anatomical distribution and the daily quantification of TPH mRNA in the CNS. In this study, we first cloned partial *tph1* and *tph2* cDNAs in rat to report specific anatomical distribution of both TPH mRNAs in DR, MR and pineal gland using radioactive *in situ* hybridization. Secondly, we assessed the daily expression of TPH mRNA under both LD and DD within DR and MR, the main serotonergic nuclei implicated in the circadian system.

## ***Materials and methods***

### ***Animals and tissues preparation***

All experiments were performed in accordance with NIH Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the French law. Adult male rats (Wistar, Faculty of medicine, Strasbourg, France), weighing 180-200 g were placed under a 12 h light and 12 h dark cycle (LD12:12). Two days before death, half of the animals were placed under constant darkness (DD) and the other half were maintained under LD cycle. Food and water were available *ad libitum* for all animals. Animals from both groups were killed by decapitation every 4 h at seven time points along 24 h (five animals per point, the first point at Zeitgeber Time 2 (ZT2) for LD animals and at circadian time 2 (CT2) for DD animals; ZT12 and CT12 being defined as the beginning of the dark period. Brains with pineal glands were quickly removed, frozen in cold isopentane and stored at -80 °C. Serial coronal sections (20 µm thick) were cut with a cryostat (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) throughout the rostral part of the RN, including DR and MR (Interaural from +1.9 mm to +0.7

mm, Paxinos & Watson, 1982). Within the same anatomical levels, sections with pineal glands were also cut. All sections were then collected on sterile and gelatine-coated slides. For immunolabelling experiments, adult male Wistar rats (180-200 g), placed under LD12:12 were deeply anaesthetized with isoflurane and then perfused transcardially with NaCl 0.9% followed with freshly prepared paraformaldehyde 4% in phosphate buffer 0.1 m (pH 7.4). Brains were removed, postfixed during 24 h at 4 °C, and finally rinsed into 0.1 m phosphate-buffered saline (PBS).

### ***TPH1 and 2 cloning***

Rat TPH1 (887 bp) and TPH2 (495 bp) cDNA fragments were PCR-amplified using the following oligonucleotides: 5'-TCGCAGAGCTGGCTATGAACTACA-3' and 5'-ACTGGGCCACCTGCTGACTCTA-3' for TPH1 (GenBank accession number: X53501); 5'-GAAGTTGGCGGGCTGGTGAGA-3' and 5'-TCGGCAAGCATGAGTGGGGTAGA-3' for TPH2 (GenBank accession number: AY098915). PCR products of the expected sizes were cloned into the pCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene, CA, USA). Identity and orientation of the cloned PCR fragments were confirmed by both enzymatic restriction analysis and sequencing (AGOWA sequencing services, Germany).

### ***Oligonucleotides and ribonucleotides probes labelling***

Sense and antisense riboprobes for TPH1 and TPH2 were transcribed from the corresponding linearized plasmids using the appropriate polymerase (MAXI script, Ambion, USA) in the presence of [35S]-UTP (1250 Ci/mmol, Amersham, UK). On the other hand, a 50-nucleotide antisense oligoprobe for TPH1 (AGAGTCACTCTCCCCCTTTCTGAG GAATGGTCTTTGTTCTCCTTGTTGTC) and for TPH2 (CTGGCACCGCTGAA TCCAAGGACAACCCTCTCCTGGCCCAGTATTTACTG) designed from a region in which both sequences are divergent was synthesized (Invitrogen, Scotland). The oligoprobes were 3' end-labelled with [35S]-dATP (1250 Ci/mmol, Amersham) using terminal deoxyribonucleotidyl transferase (8000 Units, Roche, Germany).

### ***In situ hybridization procedures***

Hybridization with riboprobes was performed as follows. Sections were postfixed in 4% formaldehyde for 10 min, acetylated twice in 0.5% acetic anhydride in 0.1 m

triethanolamine (pH 8.0) for 10 min and incubated in 0.1 m Tris (pH 7.0) with 0.1 m glycine for 30 min. For oligoprobes hybridization, sections were postfixed and acetylated twice as described for riboprobes. Thereafter, all sections were rinsed and dehydrated in graded ethanol series and then air-dried. Hybridization was carried out overnight in humid boxes by depositing 100  $\mu$ L of riboprobes (300 pm) or oligoprobes ( $10^7$  dpm/mL) at 54 °C and 37 °C, respectively. The hybridization solution contained 50% deionized formamide, 4  $\times$  sodium saline citrate (SSC) for oligoprobes vs. 2  $\times$  SSC for riboprobes, 1  $\times$  Denhardt's solution, 0.25 mg/mL yeast tRNA, 0.5 mg/mL salmon sperm DNA for oligoprobes vs. 1 mg/mL for riboprobes, 10% dextran sulphate and 10 mm dithiothreitol. After hybridization, the sections were treated with Ribonuclease A for 30 min at 37 °C (1.4  $\mu$ g/mL, Sigma, USA) only for riboprobes. Stringency washes were then performed twice for 10 min in 4  $\times$  SSC, 2  $\times$  SSC at room temperature, 15 min in 0.5  $\times$  SSC at 53 °C followed by 30 min in 0.2  $\times$  SSC at 62 °C. Sections hybridized with oligoprobes were washed in 1  $\times$  SSC at 55 °C four times for 15 min and at room temperature twice for 30 min. Finally, all sections were dehydrated in a graded ethanol series, air-dried and then exposed to an autoradiographic film (Kodak BioMax).

### ***5-HT and TPH immunohistochemistry***

Fifty-micrometre coronal sections were cut on a vibratome (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) throughout the rostro-caudal extent of the RN. Floating sections were incubated overnight at 4 °C with PBS-0.5% Triton X-100 solution containing 5-HT rabbit antiserum (Oncogene, USA) at 1:2000 or TPH sheep antiserum at 1:1000 (Chemicon, CA, USA). Thereafter, all sections were incubated for 1 h in biotinylated secondary antisera (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA, USA), rinsed with PBS and incubated for 1 h in the ABC reagents (Vector Laboratories). The antigen-antibody complex was visualized with 0.05% 3, 3' diaminobenzidine (Sigma). The brain sections were mounted on gelatinized slides, dehydrated and cover slipped for microscopy analysis.

### ***Data analysis and statistics***

Quantitative analysis of the autoradiograms was performed using a computerized analysis system (Biocom-program RAG 200). Total optical density (OD) was measured for each region of interest (MR, DR). Non-specific OD was measured for each section within mesencephalic areas where TPH2 mRNA is not specifically expressed, and then subtracted from total OD. By reference to radioactive microscales, OD was converted to relative levels



of mRNA. In order to compare the daily profiles of TPH2 mRNA levels using riboprobe hybridization within the same structure and between LD and DD condition, two-way analysis of variance (anova II) was performed with factor one 'effect of time' and factor two 'light condition, i.e. LD or DD'. Post-hoc analysis was also performed in order to examine the significant differences between time points. For oligoprobe hybridization, comparison of the mean values of TPH2 mRNA levels between ZT2 and ZT10 within the same anatomical region was assessed by using an anova I test, the tested factor being 'effect of time'. For all statistical procedures, the level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## ***Results***

### ***Technical validations***

Using antisense TPH1 riboprobe for *in situ* hybridization led to a very strong labelling of the pineal gland (Fig. 1A). Although weak, the expression of TPH1 mRNA in the DR and MR area is clear (Fig. 1A). Hybridization with TPH1 sense riboprobe demonstrated no specific labelling in both pineal gland and the raphe area (Fig. 1B). Using TPH2 antisense riboprobe, TPH2 mRNA was found to be expressed exclusively in the DR and MR; no specific signal was observed in the pineal gland (Fig. 1C). As shown in Fig. 1D, no specific labelling was observed with TPH2 sense riboprobe. The anatomical resolution obtained with TPH2 riboprobe allowed precise quantification of its levels in the raphe area. The different subdivisions of the DR as well as the rostral and caudal limits of the DR and MR are well delineated (Fig. 1E). Along the DR, several subgroups can be distinguished: the ventromedian (VM), the dorsomedian (DM) and two lateral groups (LAT), and thereafter separately quantified. The labelling we obtained in the RN using this riboprobe superimposes well with 5-HT and TPH immunohistochemistry in these nuclei, and clearly delineates the MR and DR (Fig. 1F and G). The hybridization with specific oligoprobes for TPH1 and TPH2 mRNAs (see the experimental procedures) show that TPH1 mRNA is expressed in the pineal gland but not in the RN (Fig. 2A), whereas TPH2 mRNA is exclusively expressed in RN (Fig. 2B).

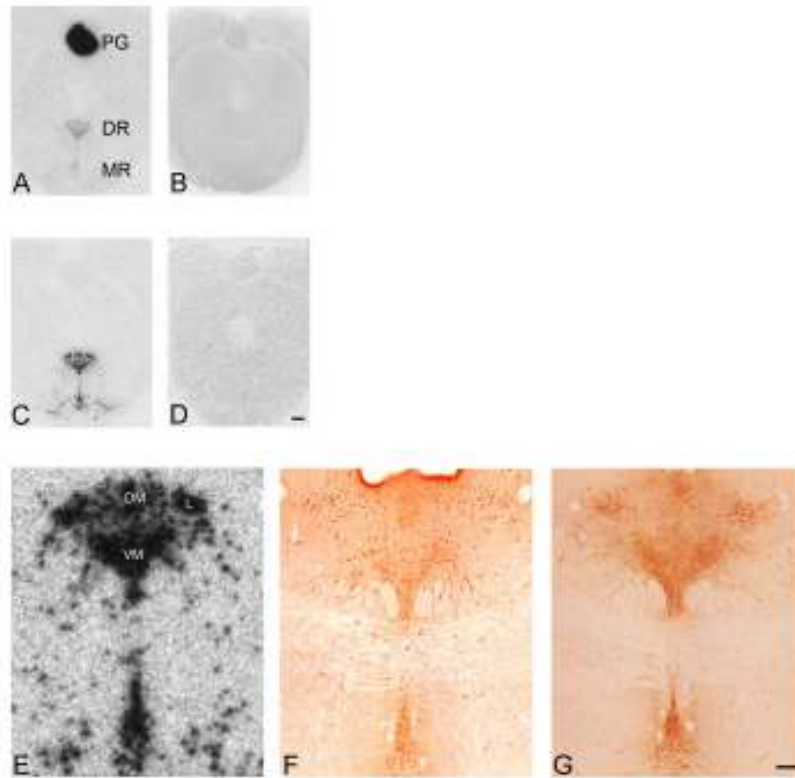


FIG. 1. Illustration of *in situ* hybridization performed on coronal sections of rat brain using different riboprobes. (A and B) TPH1 and (C and D) TPH2 antisense and sense riboprobes, respectively. Scale bar: 700  $\mu\text{m}$ . (E) TPH2 riboprobe labelling in the dorsal raphe (DR) and median raphe (MR) is superimposed with (F) 5-HT and (G) TPH immunodetection within these nuclei. Scale bar, 250  $\mu\text{m}$ . DM, dorsomedial subdivision; L, lateral subdivision; PG, pineal gland; VM, ventromedial subdivision.

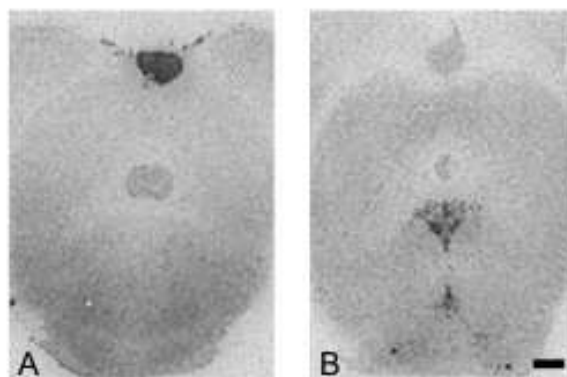


FIG. 2. (A) TPH1 and (B) TPH2 mRNA expression in the rat pineal gland and raphe nuclei, respectively, using specific oligoprobes on coronal brain sections. Scale bar, 800  $\mu\text{m}$ .

### ***Daily profiles of TPH2 mRNA levels within the RN***

The daily profiles of TPH2 mRNA levels were quantified in MR and DR subdivisions every 4 h across 24 h. Within the MR, TPH2 mRNA amount displays significant daily variation under LD12:12 cycle (Fig. 3, anova II,  $P < 0.001$ ), with highest values being observed at ZT10 (+35% compared with ZT2,  $P < 0.01$ ). At ZT10, TPH2 mRNA levels exhibit significant difference (anova II,  $P < 0.01$ ) from all the other time points. Afterwards, the expression of TPH2 mRNA drops to the basal level at ZT14. When rats were placed during 2 days under DD condition, the daily profile of TPH2 mRNA levels in MR is similar to that observed under LD cycle (Fig. 3, anova II,  $P < 0.001$  for the effect of time, the effect of light condition is not significant and no interaction between both factors). TPH2 mRNA levels increase progressively between CT2 and CT10, corresponding to the highest levels (+28% compared with CT2,  $P < 0.01$ ), and then significantly decrease from CT22 ( $P < 0.01$ ) to reach the basal values at CT2. The peak of TPH2 mRNA daily profiles is significantly broader under DD compared with LD condition (anova II,  $P < 0.05$  between ZT14 and CT14).

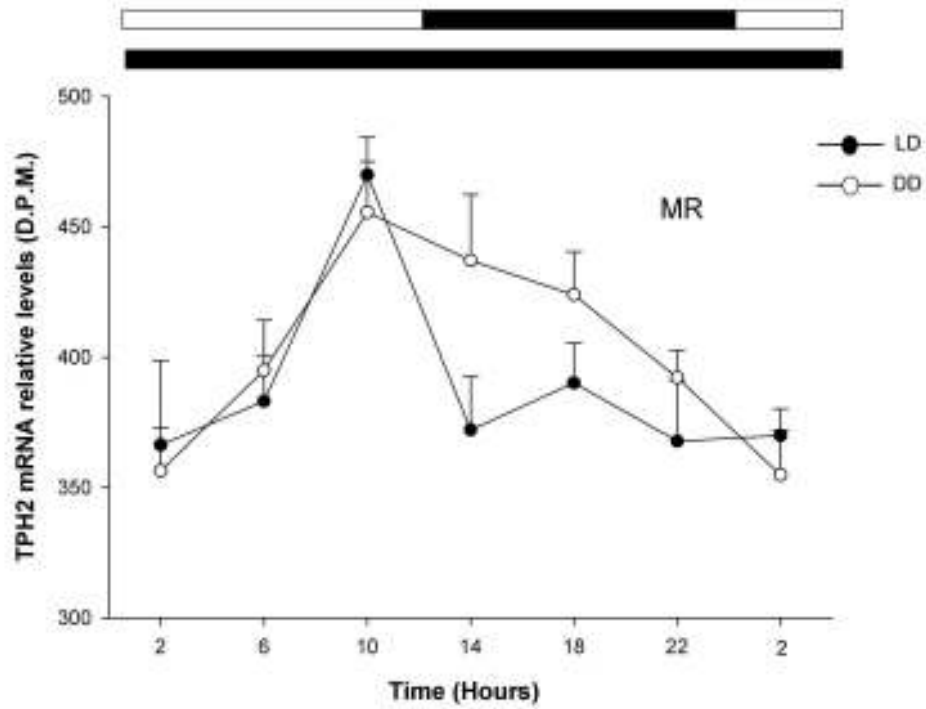


FIG. 3. Relative levels of TPH2 mRNA (using riboprobes) within the MR of rats housed under light–dark (LD) 12 : 12 (filled circles) and constant darkness (DD) condition (open circles). White bar, light period; black bar, dark period. Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM of five rats.

Within the DR, TPH2 mRNA was quantified separately in each subdivision. Under LD12:12 cycle, the amount of this mRNA exhibits significant daily variations in the DM (Fig. 4A, anova II,  $P<0.001$ ), VM (Fig. 4B, anova II,  $P<0.001$ ) as well as the LAT (Fig. 4C, anova II,  $P<0.001$ ). In all the subdivisions maximum levels of TPH2 mRNA are observed at ZT10 (33% for DM, 38% for VM and 40% for LAT, compared with ZT2). At ZT10, TPH2 mRNA levels are significantly different from all the other time points (anova II,  $P<0.01$  for DM,  $P<0.05$  for VM, and  $P<0.05$  for LAT). Under DD condition, TPH2 mRNA expression displays significant variations in all the subgroups of the DR (anova II,  $P<0.001$ , Fig. 4A-C), with similar profiles compared with LD cycle in all the subdivisions (Fig. 4, anova II,  $P<0.001$  for the effect of time within each subgroup, the effect of light condition is not significant and no interaction between both factors). The highest levels of TPH2 mRNA are observed at CT10 (21% for DM, 25% for VM and 21% for LAT, compared with CT2). Significant increase in the TPH2 mRNA levels is observed between CT2 and CT10 within each of the three subgroups (anova II,  $P<0.05$ ). Within DM and LAT, CT2 is the only time point where TPH2 mRNA levels are significantly different compared with CT10 (anova II,  $P<0.05$  for DM,  $P<0.01$  for LAT). Within VM, and after CT10, TPH2 mRNA levels decrease significantly at CT18 (anova II,  $P<0.05$ ). Significant broader peak under DD condition is observed only within VM subdivisions (anova II,  $P<0.05$  between ZT6 and CT6).

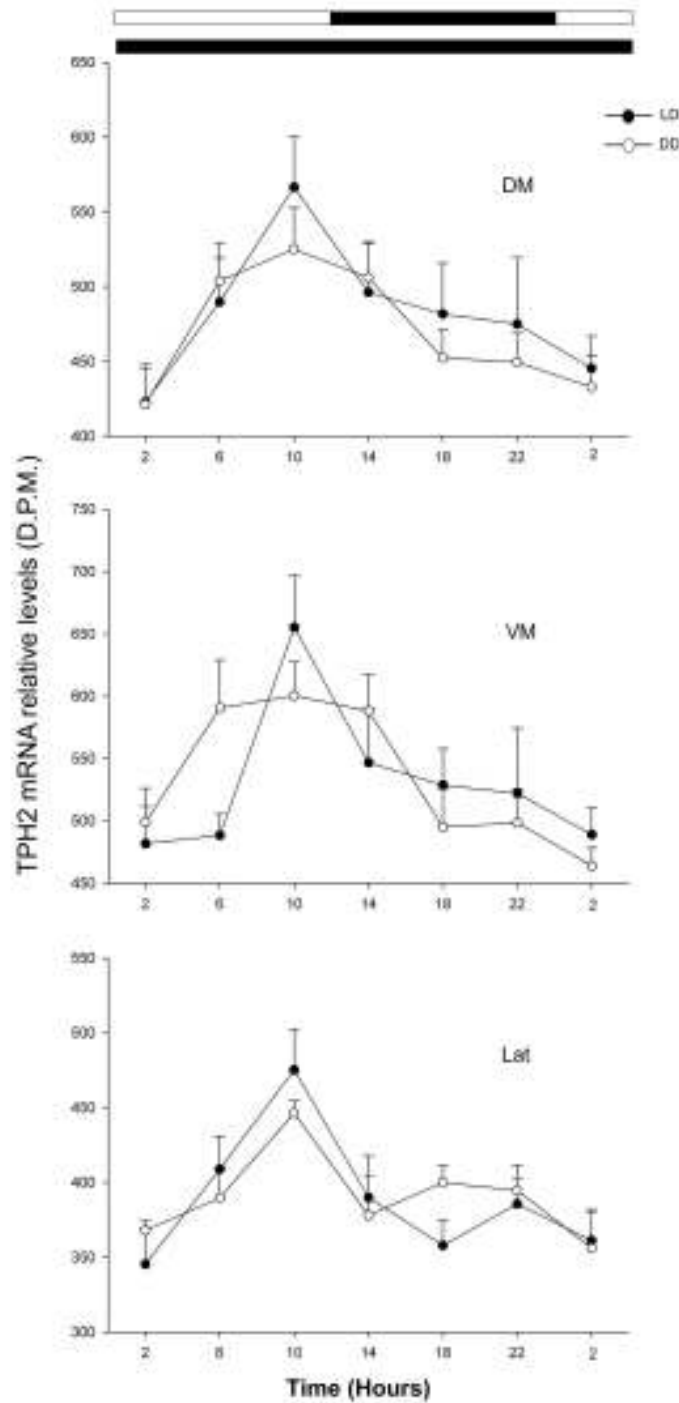


FIG. 4. Daily profiles of TPH2 mRNA levels (using riboprobe) in the (A) dorsomedian (DM), (B) ventromedian (VM) and (C) lateral groups (Lat) of the DR of rats housed under light-dark (LD) 12 : 12 cycle (filled circles) and under constant darkness (open circles). Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM of five rats. White bar, light period; black bar, dark period.

By using oligoprobes selected from region in which TPH1 and TPH2 sequences are divergent, TPH2 mRNA levels were quantified in DR and MR. We have selected two time points: ZT2 and ZT10, as the largest increase of TPH2 mRNA levels using TPH2 riboprobe is observed between those two points. In all DR subdivisions (quantified separately) and MR, TPH2 mRNA levels show significant increase between ZT2 and ZT10 (anova I,  $P < 0.01$ , 27% for VM, 30% for DM, 42% for LAT and 40% for MR, Fig. 5).

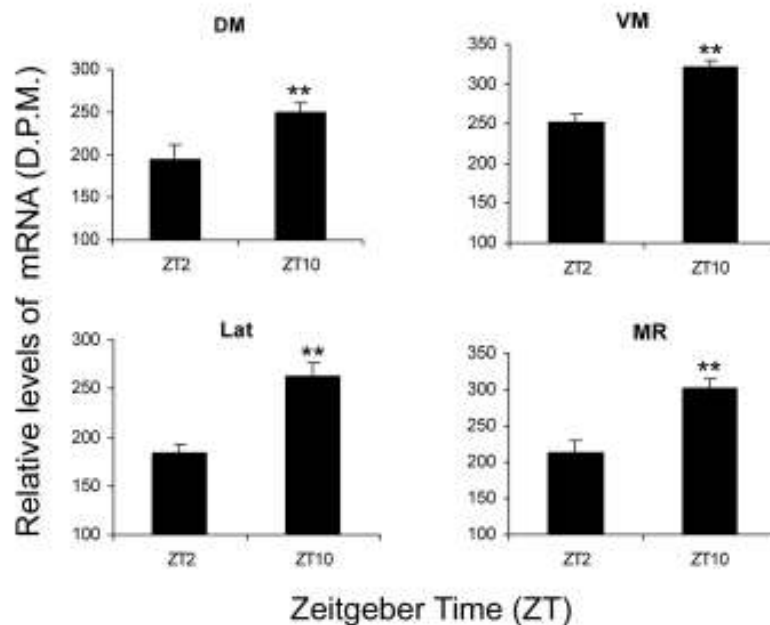


FIG. 5. Relative levels of TPH2 mRNA (using oligoprobes) in the dorsal raphe: ventromedial (VM), dorsomedial (DM) and lateral (Lat) groups as well as the median raphe (MR) for rats maintained under LD 12 : 12 cycle and killed either at ZT 2 or ZT 10. Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM of three rats. By ANOVA I, \*\* $P < 0.01$  for the effect of the time of death.

## Discussion

Within the serotonergic neurons, TPH enzyme catalyses the first and rate-limiting step of 5-HT synthesis (Lovenberg *et al.*, 1967; Jequier *et al.*, 1969). This protein exhibits rhythmic variation with phase opposition between the soma (MR and DR) and the terminals of the circadian system (SCN and IGL, Barassin *et al.*, 2002; Malek *et al.*, 2004). This rhythmic synthesis of 5-HT is correlated with its rhythmic release within the SCN and the IGL (Dudley *et al.*, 1998; Barassin *et al.*, 2002; Grossman *et al.*, 2004). These early reports indicate that 5-HT neurons projecting to the circadian structures exhibit rhythmic functioning.

Actually, the question regarding the level(s) at which the rhythmic message is conveyed to the 5-HT neurons arises. Does it happen at the translational and/or at the transcriptional level(s)? To answer this question we used specific probes that allow us to accurately report the anatomical distribution of both TPH1 and TPH2 mRNA in the raphe and pineal gland. We also investigated the daily profiles of TPH2 mRNA in the raphe of rats housed either under LD12:12 cycle or DD condition.

### ***Tissue-specific expression of TPH mRNA***

TPH mRNA expression in RN was found in very weak levels compared with the pineal gland, and it has been suggested that TPH mRNA levels, contrary to TPH protein amounts, were several folds lower in DR compared with the pineal gland (Dumas *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1991). The primers used to PCR-amplify TPH mRNA in these studies were selected according to the known sequence of pineal *tph*. Actually, we know that there are two different genes encoding tissue-specific proteins: TPH1 in the pineal gland and TPH2 in raphe nuclei (Cote *et al.*, 2003; Walther & Bader, 2003; Walther *et al.*, 2003). The fact that TPH2 riboprobe (obtained from RN cDNA) labelled raphe and not pineal gland confirms that TPH2 is exclusively expressed in these nuclei. Furthermore, no sequence homology was found after comparing TPH1 mRNA and our TPH2 riboprobe. By consequence, TPH2 riboprobe is a tissue-specific tool and could be used in further investigations concerning TPH2 mRNA expression in the raphe. The specific labelling of TPH2 riboprobe in DR and MR is confirmed by 5-HT and TPH immunohistochemistry, both considered as specific markers for serotonergic neurons. On the other hand, using TPH1 riboprobe (obtained from pineal gland cDNA), we observed signals in both pineal gland and raphe, with relative intensities corresponding to early published data by other groups: very low levels in the DR and the MR, and strong labelling in the pineal (Dumas *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1991). In order to investigate whether both genes are expressed in the raphe, we have designed specific oligoprobes selected from regions in which TPH1 and TPH2 are divergent. *In situ* hybridization with these oligoprobes showed tissue-specific expression of TPH1 and TPH2 mRNAs in the pineal gland and the raphe, respectively. These results suggest that TPH1 riboprobe we used cross-reacted with TPH2 mRNA expressed in the raphe, as no TPH1 mRNA expression was reported by using the specific corresponding oligoprobe. Indeed, the possibility of cross-reaction between TPH1 riboprobe and TPH2 mRNA is supported by the fact that TPH1 riboprobe sequence displays 63% of homology with TPH2 mRNA. Our data



and recent reports (Cote *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) suggest that the synthesis of 5-HT within the CNS could be under the control of *tph2* gene. The anatomical evidence that we obtained are in accordance with previous studies describing by *in situ* hybridization experiments tissue-specific expression of TPH1 and 2 in the rat pineal gland and raphe, respectively (Patel *et al.*, 2004).

### ***TPH2 mRNA variations***

Under LD12:12 cycle, TPH2 mRNA presents daily variations in MR and in all DR subdivisions, with maximum levels being observed 2 h before the day-night transition (ZT10). These results were confirmed by using TPH2-specific oligoprobes. Similarly, TPH2 mRNA shows increasing levels at ZT10 compared with ZT2 in both median and dorsal raphe nuclei. When animals were placed for 2 days before death under DD condition, TPH2 mRNA levels also display circadian variation in both MR and DR. Under both lighting conditions, TPH2 mRNA amounts peak at about the same time, i.e. ZT/CT10. In our study, the peak of TPH2 mRNA expression is observed 8 h before the maximum values of protein amount under both LD and DD (Malek *et al.*, 2004). This 8 h delay between the peak of TPH2 mRNA levels and TPH protein amount is probably due to the time needed for the translation of TPH2 mRNA. The profile of TPH2 mRNA under DD is larger within MR and VM subgroup, as broader peaks were observed compared with LD, further experiments should aim at the elucidation of such a difference.

In a previous study, TPH protein amount quantified in the DR-IGL pathway by immunautoradiography showed circadian variation only in the lateral parts of the DR (Malek *et al.*, 2004). This result corroborates with early tracing studies that have demonstrated that 5-HT input to the IGL might be originating from those lateral parts of the DR (Pasquier & Villar, 1982; Villar *et al.*, 1988), and we have suggested that 5-HT synthesis might be circadian only in the pathway DRLAT-IGL (Malek *et al.*, 2004). The present study, however, clearly demonstrates that the circadian variation of TPH2 mRNA levels is observed in the lateral parts as well as in the ventromedian and the dorsomedian parts of DR. These regional differences between protein and mRNA variations could be explained by the fact that TPH mRNA and/or TPH protein half-life might be differently regulated in each of the DR subdivisions. Indeed, it has been demonstrated by Weissmann *et al.* (1990) that the turnover rate of TPH protein differs in the subgroups of the DR, and the lowest values were observed within the lateral groups of this nucleus.

The present report demonstrates two important findings. The first concerns the correlation between TPH protein and mRNA rhythmic variations within DR and MR, suggesting that 5-HT synthesis in MR-SCN and DR-IGL pathways is rhythmically regulated at the level of *tph2* gene expression. The second concerns TPH2 mRNA expression under DD conditions, the fact that daily variation is maintained in constant conditions indicates that 5-HT synthesis is not responding passively to the light-dark cycle and thus is endogenously regulated. Furthermore, the circadian synthesis of 5-HT in both MR-SCN and DR-IGL pathways is correlated with rhythmic variation of TPH enzyme activity in the raphe (Kan *et al.*, 1977; Poncet *et al.*, 1993) and rhythmic release of 5-HT and 5-HIAA within the SCN and IGL (Faradji *et al.*, 1983; Ramirez *et al.*, 1987; Dudley *et al.*, 1998; Barassin *et al.*, 2002; Grossman *et al.*, 2004). All these data consider different steps of 5-HT transmission and confirm the rhythmic functioning of the 5-HT neurons within the MR-SCN and DR-IGL pathways. This circadian rhythmicity could be either under the direct control of the SCN or generated by the raphe neurons. Actually, it has become obvious that, apart from the SCN, many different brain regions possess molecular mechanism implying clock genes (Abe *et al.*, 2002), which underlay the presence of circadian oscillators that are somewhat subordinate to the SCN (Sakamoto *et al.*, 1998; Akhtar *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2004). In the case of the raphe nuclei, it seems that clock genes are not expressed, or expressed at levels below detection thresholds (Shieh, 2003; Malek & Raison, unpublished), which make it unlikely that transcription of the *tph2* gene depends on an endogenous raphe oscillator. Thus, assuming that it is the endogenous master clock of the SCN that controls the rhythmic synthesis of 5-HT, this process could be mediated *via* hormonal messengers such as corticoids or melatonin, both known to influence the functioning of the serotonergic neurons. It has been shown that melatonin can modulate the synthesis of 5-HT in the SCN (Miguez *et al.*, 1996). Corticoids are also able to influence the synthesis of 5-HT by acting on TPH enzyme activity, protein amounts and mRNA levels (Singh *et al.*, 1990a; Azmitia *et al.*, 1993; Clark & Russo, 1997; Clark *et al.*, 2005). The effect of corticoids on 5-HT neurons is mediated by the glucocorticoid receptors present within the raphe nuclei (Harfstrand *et al.*, 1986; Aronsson *et al.*, 1988). It has been demonstrated that the effect of corticosterone on photic synchronization of locomotor activity is modulated by 5-HT input to the SCN (Sage *et al.*, 2004). Thus, corticosterone might drive the rhythmic synthesis of 5-HT within the raphe neurons projecting to both SCN and IGL. Further experiments should be done in order to investigate the role of corticosterone in the rhythmic synthesis of 5-HT. Several studies have investigated the

correlation between the electrical activity of raphe serotonergic neurons and the sleep-wake cycle (for review, see Jacobs & Fornal, 1991; Jacobs & Azmitia, 1992). In nocturnal rodents, the peak of 5-HT release within the SCN and the IGL (Dudley *et al.*, 1998; Barassin *et al.*, 2002; Grossman *et al.*, 2004) is correlated with the onset of locomotor activity. Furthermore, it has been shown that access to novel running wheel during the light period can enhance the release of 5-HT within the SCN of hamsters (Dudley *et al.*, 1998). We can emphasize that locomotor activity could participate in transmitting the SCN control to the raphe 5-HT neurons. In addition to the hormonal and the behavioural messengers, the rhythmic message from the SCN could arise from a neuronal pathway to the RN. Single or several of these three components might influence the endogenous phenomenon observed in these serotonergic nuclei.

In conclusion, we have elaborated tissue-specific tools, which allow investigating *tph1* and *tph2* genes expression. Our results confirm the hypothesis of a rhythmic functioning of the 5-HT neurons projecting to the circadian structures. This rhythmicity is demonstrated by circadian variation of 5-HT release within the SCN and the IGL (Barassin *et al.*, 2002; Grossman *et al.*, 2004), correlated with circadian variations of 5-HT synthesis at the level of TPH protein and mRNA (Barassin *et al.*, 2002; Malek *et al.*, 2004; and the present study). We can further suggest that the circadian synthesis and release of 5-HT in both MR-SCN and DR-IGL pathways might be directly or indirectly controlled by the master clock.

**Chapitre III : Glucocorticoïdes, activité locomotrice et expression de l'ARNm de la tryptophane hydroxylase-2**



## *Analyse bibliographique*

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié deux paramètres impliqués dans la régulation de la synthèse de 5-HT au sein des voies neuronales afférentes aux SCN et IGL. Sur une échelle journalière, ces deux paramètres, l'ARNm de la TPH2 et la protéine TPH, présentent des profils d'expression circadiens. Ces variations circadiennes ne seraient pas endogènes aux Raphés, puisque les gènes de l'horloge, considérés comme des marqueurs des systèmes oscillants, ne sont pas exprimés dans ces noyaux (Shieh, 2003).

Nous pouvons ainsi envisager que les variations circadiennes de l'ARNm de la TPH2 et de la protéine TPH soient générées par l'horloge principale des SCN *via* une ou plusieurs sorties rythmiques de celle-ci. Parmi les sorties de l'horloge, nous avons envisagé l'implication de la sécrétion rythmique de corticostérone, un signal endocrine, et l'activité locomotrice, un signal comportemental. Ces deux paramètres en effet, comme expliquer ci-dessous, sont connus pour interagir avec le système sérotoninergique et sont capables de modifier son fonctionnement.

- ***Effets des glucocorticoïdes sur le système sérotoninergique***

Plusieurs paramètres relatifs au fonctionnement des neurones sérotoninergiques sont influencés par les glucocorticoïdes. De nombreuses études ont examiné l'effet de l'administration chronique et/ou aiguë des glucocorticoïdes sur **l'activité électrique des neurones sérotoninergiques**. Sur des préparations *in vitro*, l'application de corticostérone ne modifie pas la décharge spontanée des neurones du RD mais diminue l'effet inhibiteur des agonistes 5-HT<sub>1A</sub> sur cette activité neuronale (Laaris *et al.*, 1995). Une autre étude démontre que seul le traitement chronique par la corticostérone est capable d'empêcher cet effet inhibiteur des agonistes 5-HT<sub>1A</sub> (Fairchild *et al.*, 2003). Un tel effet sur les neurones du RD a été également mis en évidence dans certaines conditions de stress, telles que le stress d'isolement (Laaris *et al.*, 1997 ; 1999). Il a donc été suggéré que les glucocorticoïdes induiraient une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'administration de corticostérone ne modifie pas les niveaux d'expression de ces récepteurs (Laaris *et al.*, 1995 ; Fairchild *et al.*, 2003).

Les glucocorticoïdes modulent **la synthèse de 5-HT** en agissant à la fois sur l'activité enzymatique et les quantités de protéine et d'ARNm de la TPH. Un traitement à court terme

(4 h) par la dexaméthasone, un analogue synthétique des glucocorticoïdes, n'induit aucune modification des quantités de protéine TPH dans le RD et le RM, alors qu'une augmentation est constatée suite à l'administration quotidienne de ce glucocorticoïde pendant 1 à 10 jours (Azmitia *et al.*, 1993). En revanche, un traitement à long terme (4 ou 7 jours) par la dexaméthasone induit une diminution de l'expression de l'ARNm de la TPH dans les deux noyaux du Raphé (Rat : Clark & Russo, 1997, Souris : Clark *et al.*, 2005). Par ailleurs, plusieurs études ont évalué la synthèse de 5-HT en conditions de stress et ont montré que la protéine et l'ARNm de la TPH sont modifiés selon le stress appliqué (Singh *et al.*, 1990a ; Chamas *et al.*, 2004 ; Abumaria *et al.*, 2006a).

Les glucocorticoïdes pourraient agir directement sur les neurones sérotoninergiques *via* les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), permettant ainsi de moduler l'expression du gène codant la TPH. En effet, les récepteurs GR ont été mis en évidence dans les neurones des noyaux du Raphé (Aronsson *et al.*, 1988 ; Ahima & Harlan, 1990 ; Morimoto *et al.*, 1996) et sont co-exprimés avec la 5-HT (Härfstrand *et al.*, 1986) et la TPH (Figure 26).

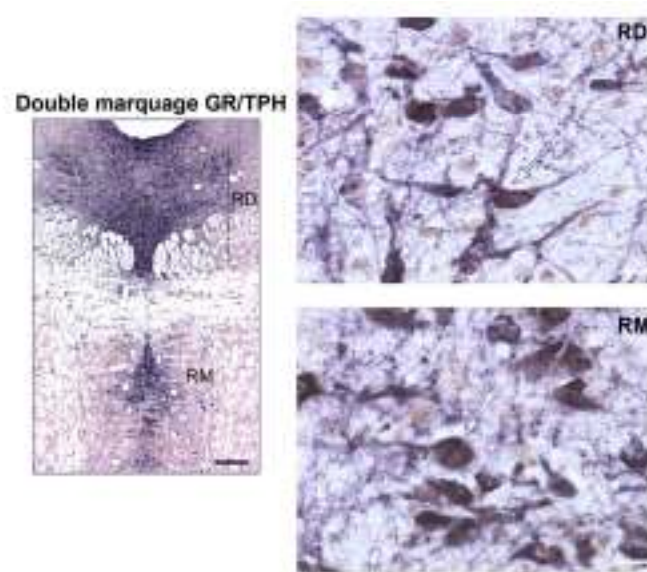


Figure 26 : Détection immunocytochimique de la TPH et du récepteur GR dans les neurones sérotoninergiques du RM et du RD (à gauche, barre d'échelle 250 µm). Les cellules marquées sont visualisées à fort grossissement (à droite, barre d'échelle 30 µm), la TPH est localisée dans le cytoplasme (bleu foncé), le GR dans le noyau (marron).

Une action indirecte *via* d'autres systèmes de neurotransmission capables d'interagir avec le système sérotoninergique n'est cependant pas à exclure. L'exemple de la modulation de l'activité enzymatique de la TPH en conditions de stress provoqué par les stimuli auditifs illustre cette éventualité. En effet, l'augmentation de l'activité enzymatique de la TPH suite à ce type de stress est bloquée après surrénalectomie (Singh *et al.*, 1990a) mais aussi suite à une lésion bilatérale de l'amygdale centrale (Singh *et al.*, 1990b). De plus, l'application du CRF (*Corticotropin Releasing Factor*) dans l'amygdale centrale induit, dans le RD, une augmentation de l'activité enzymatique de la TPH similaire à celle observée après une stimulation auditive provoquant un stress (Boadle-Biber *et al.*, 1993). Ainsi, bien qu'il soit dépendant des glucocorticoïdes, l'effet du stress auditif sur l'activité enzymatique de la TPH pourrait s'effectuer indirectement *via* une activation de l'amygdale centrale et un mécanisme CRF-dépendant. Cette hypothèse est renforcée par des études anatomiques montrant l'existence d'une projection entre l'amygdale centrale et le RD (Russchen, 1982) et des fibres contenant le CRF dans le RD (Lowry *et al.*, 2000).

Les conditions de stress induisent une augmentation de **la libération de 5-HT** dans plusieurs régions du cerveau. Par exemple, le stress provoqué par le test "de la nage forcée" augmente la libération de 5-HT dans l'amygdale centrale, le RM (Adell *et al.*, 1997) ainsi que dans le striatum (Kirby *et al.*, 1997). De même, le stress provoqué par une injection systémique d'une solution saline entraîne une augmentation de la libération de 5-HT dans le RM, le RD et le cortex préfrontal (Adell *et al.*, 1997). L'effet du stress sur la libération de 5-HT serait dû à une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aboutissant à une facilitation de la transmission sérotoninergique. L'implication d'autres systèmes de neurotransmission et notamment des afférences noradrénergiques issues du Locus Coeruleus (Baraban & Aghajanian, 1981; Peyron *et al.*, 1996) est également envisageable. Les neurones noradrénergiques du Locus Coeruleus expriment les récepteurs GR (Härfstrand *et al.*, 1986) et sont ainsi sensibles à l'action des glucocorticoïdes. En conditions de stress d'immobilisation, les glucocorticoïdes sont capables de moduler la synthèse de noradrénaline en agissant sur l'expression du gène de la tyrosine hydroxylase (Makino *et al.*, 2002). La noradrénaline exerce une action excitatrice sur les neurones sérotoninergiques (Baraban & Aghajanian, 1980) et peut moduler la synthèse (Esteban *et al.*, 1996) et la libération (Pudovkina *et al.*, 2003) de 5-HT. Cette dernière étude a montré que la libération de 5-HT dans le RD augmente suite à l'activation des récepteurs adrénergiques  $\alpha_1$  du même noyau, alors que l'action des



récepteurs  $\alpha_2$  l'inhibe. Ainsi, l'induction de la libération de 5-HT en conditions de stress pourrait s'effectuer *via* une structure relais qui est le Locus Coeruleus.

Les effets des glucocorticoïdes sur le fonctionnement des neurones sérotoninergiques ont été largement documentés en relation avec les conditions de stress. Cependant, les expériences visant à explorer ces effets n'ont nullement considérées la nature circadienne de ces deux paramètres.

- ***Effets de l'activité locomotrice sur le système sérotoninergique***

Le fonctionnement des neurones sérotoninergiques est influencé par le comportement locomoteur ainsi que par le cycle veille/sommeil. En effet, l'activité électrique des neurones sérotoninergiques est modifiée en fonction du cycle veille/sommeil, avec une fréquence de décharge neuronale qui devient plus lente pendant la phase du sommeil (Trulson & Jacobs, 1979). La libération de 5-HT augmente pendant la période d'activité dans les SCN (Dudley *et al.*, 1998 ; Barassin *et al.*, 2002), les IGL (Grossman *et al.*, 2004), le RD, le cortex frontal (Portas *et al.*, 1998) et l'hippocampe (Kalén *et al.*, 1989). De plus, l'induction de l'activité locomotrice par une roue ou par l'exercice forcé entraîne une augmentation de la libération de 5-HT dans les SCN (Dudley *et al.*, 1998), les IGL (Grossman *et al.*, 2004), le cortex frontal et l'hippocampe (Béquet *et al.*, 2001 ; Gomez-Merino *et al.*, 2001).

D'autre part, il a été démontré que l'accès à la roue peut entraîner des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le fonctionnement des neurones sérotoninergiques (Chennaoui *et al.*, 2001 ; Greenwood *et al.*, 2005). Trois semaines d'accès à la roue sont suffisants pour provoquer une diminution des niveaux d'ARNm du transporteur de 5-HT dans le RD et le RM. Le même résultat est observé par rapport aux récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, mais leurs niveaux d'expression diminuent uniquement dans le RD-VM. Une diminution de l'expression de ce récepteur a été également mise en évidence dans le cervelet et le cortex frontal. Concernant les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, l'effet d'un accès prolongé à la roue (6 semaines) se traduit par une augmentation de leurs niveaux d'expression dans le RM, RD-LAT et le RD-DM. Récemment, une étude a évalué l'effet de l'activité locomotrice forcée sur l'expression du gène  *tph2*  dans le RM et le RD et n'a montré aucune modification des niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 (Foley *et al.*, 2006). En revanche, d'autres études ont démontré que l'activité locomotrice forcée provoque une augmentation du nombre des neurones contenant la TPH (Lim *et al.*, 2001) et la 5-HT (Lee *et al.*, 2002) dans le RD et le RM. Il est important

de noter que la rythmicité de l'expression de l'ARNm de la TPH2 et de la protéine TPH n'a jamais été prise en considération pendant la réalisation de ces études.

**Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de l'abolition et de la restauration artificielle du rythme de corticostérone sur les profils journaliers de l'ARNm de la TPH2 dans le RM et le RD. D'autre part, nous avons examiné l'effet de l'induction de l'activité locomotrice par un accès prolongé à une roue sur les niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 dans les deux noyaux du Raphé.**

**Enfin, nous avons considéré l'interaction des deux signaux, endocrine et comportemental, en évaluant l'effet de l'induction de l'activité locomotrice sur l'expression du gène  *tph2*  en absence du rythme journalier de corticostérone.**



# **Daily rhythm of Tryptophan Hydroxylase2 mRNA within Raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity**

**Zeina S. MALEK, Dominique SAGE, Paul PEVET and Sylvie RAISON**

**Submitted – Revised Form**

## ***Abstract***

Tryptophan hydroxylase (TPH, the rate-limiting enzyme of serotonin synthesis) protein and mRNA levels display a circadian expression in the rat dorsal and median Raphe. These patterns suggest a rhythmic synthesis of serotonin under the control of the master clock of suprachiasmatic nuclei. In the present study, we examined the involvement of endocrine and behavioral output signals of the master clock upon the TPH2 mRNA levels by quantitative *in situ* hybridization.

In the absence of adrenals, a complete suppression of TPH2 mRNA rhythm was observed in dorsal and median Raphe over 24h. The restoration of corticosterone daily variations in adrenalectomized rats induced a TPH2 mRNA rhythmic pattern *de novo*, indicating that TPH2 mRNA rhythm is dependent upon daily fluctuations of glucocorticoids. Enhanced voluntary locomotor activity during 6 weeks increased the level of TPH2 mRNA in both Raphe nuclei of control rats without concomitant increase of corticosterone plasma levels. Moreover, this long-term enhanced locomotor activity was able to restore significant variation of TPH2 mRNA in adrenalectomized rats.

In conclusion, both endocrine and behavioral cues can modulate *tph2* expression in dorsal and median Raphe. Corticosterone surge acts as a rhythmic cue that induces the rhythmic expression of *tph2* in the Raphe neurons. On the other hand, long-term exercise modulates the expression levels of this gene. Thus, the 5-HT neurons are a target for both endocrine and behavioral circadian cues and the 5-HT input to the SCN might feedback and influence the functioning of the clock itself.

## ***Introduction***

Serotonin (5-HT) is involved in various physiological and behavioral functions (for review see Lucki, 1998). A number of these functions, including sleep, locomotor activity or feeding behavior, have a time-related organization controlled by the central clock located within the suprachiasmatic nuclei (SCN). Moreover, the 5-HT input to the SCN, arising from Raphe nuclei (Meyer-Bernstein and Morin, 1996; Hay-Schmidt *et al.*, 2003), is known to modify the phase of the circadian pacemaker (for review see Yannielli and Harrington, 2004).

We have previously demonstrated daily variations of 5-HT release within the SCN of rats (Barassin *et al.*, 2002), associated with rhythmic protein and mRNA profiles of tryptophan hydroxylase (TPH), the rate-limiting enzyme in 5-HT synthesis (Lovenberg *et al.*, 1967) within Median and Dorsal Raphe nuclei (MR, DR respectively; Malek *et al.*, 2004; 2005). The rhythm of TPH2 mRNA levels that has been shown to be circadian in nature (Malek *et al.*, 2005), is thus under SCN control. The SCN are known to distribute circadian messages *via* neural, endocrine and behavioral outputs (for review see Kalsbeek *et al.*, 2006). The question is thus to identify the SCN output signals responsible for the rhythmic *tph2* gene expression.

The glucocorticoids daily surge is one of the most convincing candidates: i) corticosterone circadian secretion is directly under SCN control (Moore and Eichler, 1972); ii) glucocorticoids receptors are expressed in 5-HT neurons (Härfstrand *et al.*, 1986) and iii) several studies designed with stress paradigms or with glucocorticoids administration, report an action on TPH mRNA, protein levels and activity (Park *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1990a; Azmitia *et al.*, 1993; Clark and Russo, 1997; Chamas *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2005).

Locomotor activity, a behavior for which the temporal organization is also under SCN control, should also be considered especially since functional relationships have been established with the 5-HT system. For example, 5-HT neuronal firing rates and 5-HT release in several brain areas are highly correlated with behavioral states (Cespuglio *et al.*, 1981; Rueter and Jacobs, 1996; Jacobs and Fornal, 1999). The onset of locomotor activity also occurs at the beginning of the night period, when extracellular levels of 5-HT are at their highest in the SCN (Dudley *et al.*, 1998; Barassin *et al.*, 2002). Moreover, access to a running wheel for several hours at midday acutely enhances 5-HT release, at least within the SCN (Dudley *et al.*, 1998). Finally, long-term voluntary access to a running wheel has been

demonstrated to modulate the expression of several markers in 5-HT neurons (Greenwood *et al.*, 2005).

This study was designed to determine whether hormonal and/or behavioral outputs of the SCN, namely the daily corticoid surge and locomotor activity are involved in the daily rhythmic expression of TPH2 mRNA within DR and MR. The *tph2* gene expression was evaluated over 24 h after experimental manipulations of the plasma corticosterone secretion. The effect of long-term voluntary exercise on TPH2 mRNA expression was also assessed after access to a running wheel. Furthermore, since interactions between corticosterone release and long-term exercise have been previously described (Fediuc *et al.*, 2006), the ability of enhanced locomotor activity to modulate the expression of *tph2* was also investigated in the absence of the corticosterone daily surge.

## ***Material and methods***

### ***Animals care***

All experiments were performed in accordance with NIH Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, with the *European Communities Council Directive* of 24 November 1986 (86/6.9/EEC) and the French laws. Five-week old male rats (Wistar, Charles River, l'Arbresle, France), weighing 180-200 g were housed under a 12 h light and 12 h dark cycle (LD 12 : 12), with dim red light (<2 lux) continuously. Referential Zeitgeber Time (ZT0) was defined as the beginning of the light period. All animals were left for one week in the animal facility before the experiments. During the experiment, animals were housed individually in transparent plastic cages and had free access to food and water (details in part B and C).

### ***Surgery***

Adrenalectomy was performed bilaterally according to a dorsal approach under deep anesthesia (Zoletil 20mg/ml at 0.2ml/100g and Rompun 2% at 0.05ml/100g). After incising skin and muscles, adrenal glands were quickly removed and subcutaneous pellets containing 10 % of corticosterone and 90 % cholesterol (Sigma) were implanted (ADX-Cort-10 rats). Sham animals (SHAM) were operated as described above but without removing adrenals and received 100% cholesterol control pellets. The pellets (12 mm length x 6 mm width x 4 mm

depth, weighing 240-260 mg) were prepared as described in a previous report (Maurel *et al.*, 2000). 10% corticosterone pellets have been used in ADX-Cort-10 rats in order to provide a constant level of this hormone and at the corresponding diurnal amount measured in control rats (Maurel *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2004). ADX-Cort-10 rats were given drinking water containing 0.9 % NaCl.

### ***Animal treatments and brain collection***

#### *Corticosterone supplementation*

In order to experimentally reinstate the nocturnal peak of corticosterone in adrenalectomized ADX-Cort-10 rats, drinking water was replaced during the night (from ZT12 to ZT 0), by a corticosterone containing solution (50µg/ml of corticosterone in 0.9 % NaCl), this group of rats is named ADX-Cort-Rhythmic (ADX-Cort-R). During daytime, the ADX-Cort-R rats had drinking water with 0.9 % NaCl. These rats were supplemented in corticosterone during one week and compared with SHAM and ADX-Cort-10 rats.

SHAM, ADX-Cort-10 and ADX-Cort-R rats were killed two weeks after surgery across the day/night cycle at the following time-points: ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT16, ZT18 and ZT23. Brains were quickly removed, frozen in cold isopentane and stored at -80°C until section preparation. To verify if adrenalectomy was effective, thymus glands were weighed. As expected, thymus hyperplasia (Milkovic *et al.*, 1964; Sage *et al.*, 2004) was observed in ADX-Cort-10 rats (960±20 mg) whereas corticosterone replacement in ADX-Cort-R rats re-established the same range of thymus weigh (650±20 mg) as for the SHAM group (610±20 mg).

#### *Locomotor activity*

Rats were housed individually in cages either with or without a running wheel (Ø=30 cm). In order to ensure that the surgery has no effect upon locomotor activity, in addition to SHAM and ADX-Cort-10 rats, a control non-operated group of rats (CONT) was used for this study. During 6 weeks, wheel running locomotor activity was quantified using Dataquest III acquisition system (Data Sciences Co, MN). Animals were killed at two time-points, ZT2 and ZT10, at which the TPH2 mRNA variation had already been characterized (Malek *et al.*, 2005). Brains were quickly removed and frozen as described for the first experiment. As observed in the previous study, only ADX-Cort-10 rats showed hyperplasia of

thymus glands that weighed  $900\pm 40$  mg and  $920\pm 50$  mg respectively, for rats with and without access to a running wheel in their cages. All the SHAM and CONT rats exhibited the same range of thymus glands weights (with wheel: SHAM:  $640\pm 50$  mg, CONT:  $620\pm 40$  mg; without wheel: SHAM:  $660\pm 50$  mg, CONT:  $540\pm 30$  mg).

### ***Blood sampling and corticosterone measurements***

Since no stress-effect on plasma corticosterone concentrations is expected in ADX-Cort-10 and ADX-Cort-R rats, trunk blood was collected at the moment of the decapitation. In SHAM and CONT animals, to avoid the effect of stress on corticosterone concentrations during the decapitation, *in vivo* blood sampling was performed by intracarotid cannulation using PE-50 polyethylene tubing (Instech laboratories, USA). In addition, some ADX-Cort-10 rats used for the enhanced locomotor activity study were also cannulated in the carotid to ensure that this surgery had no effect on the running wheel behavior. For 3 days after cannulation rats were handled gently twice daily to minimize handling stress on the day of sampling. Blood samples (200 $\mu$ l) were collected, on the 4th day at the same time-points as euthanasia, into heparin containing tubes and centrifuged (2800 rpm at 4°C). The resulting serum was stored at -20°C. Circulating corticosterone concentrations were assessed in duplicates using a protocol adapted from the commercially available radio immunoassay kit (MP Biomedical. UK). The sensitivity limit of the assay was 7.7 ng/ml, and the reproducibility of the method was determined by evaluating INTRA-assay variation (7.1 %) and INTER-assay variation (6.5 %).

### ***In situ hybridization procedure***

Brains were cut in serial coronal sections (20  $\mu$ m thick) with a cryostat (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) throughout the rostral part of the Raphe, including DR and MR (Interaural from +1.9 mm to +0.7 mm, Paxinos and Watson, 1982) and collected on sterile and gelatin coated slides.

For *in situ* hybridization, sense and antisense riboprobes for TPH2 were obtained as described in Malek et al. (2005). Probes were transcribed from the corresponding linearized plasmids using the appropriate polymerase (MAXI script, Ambion, USA) in the presence of [35S]-UTP (1250 Ci/mmol, Amersham, UK). Hybridization was performed as described previously (Malek *et al.*, 2005). Briefly, sections were postfixed in 4% formaldehyde for 10 min, acetylated twice for 10 min in 0.5 % acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine, (pH 8.0).

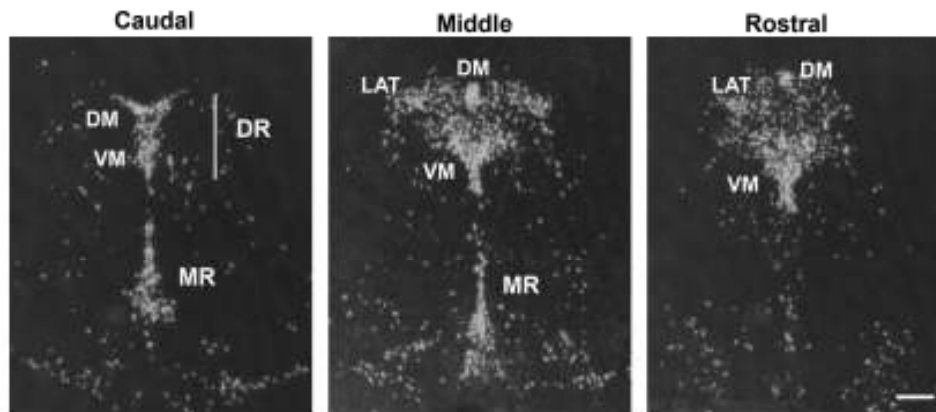


Thereafter, sections were rinsed, dehydrated and air-dried. Hybridization was carried out overnight at 54°C in humid boxes by depositing 100 µl of riboprobes (300 pM) in a solution containing 50 % deionized formamide, 2X sodium saline citrate (SSC), 1X Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 1 mg/ml salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate and 10 mM dithiothreitol. After hybridization, the sections were treated with Ribonuclease A for 30 min at 37°C (1.4 µg/ml, Sigma, USA). After several stringency washes performed in 4X SSC, 2X SSC, 0.5X SSC and 0.2 X SSC, sections were dehydrated, air-dried and then exposed to an autoradiographic film (Kodak BioMax). Some slides were dipped with nuclear emulsion (Hypercoat Emulsions Amersham Biosciences, UK) diluted 1:2 in H<sub>2</sub>O and exposed for 3 weeks at 4°C. Emulsions-slides and films were developed using Kodak BioMax reagents.

### ***Data analysis and statistics***

Quantitative analysis of the autoradiograms was performed using a computerized analysis system (Biocom-program RAG 200). Total optical density (OD) was measured for each region of interest (MR, DR). The area of TPH2 mRNA expression of each region was measured and was similar between all experimental groups. Non-specific OD was measured for each section within mesencephalic areas where TPH2 mRNA is not specifically expressed, and then subtracted from total OD. By reference to radioactive microscales, the OD was converted to D.P.M. (disintegrations per minute) in order to evaluate the expression levels of TPH2 mRNA within the regions of interest.

Figure 1 illustrates TPH2 mRNA detection after *in situ* hybridization followed by a nuclear emulsion at three representative regions of mesencephalic area containing Raphe nuclei: caudal (left panel; Interaural: +0.7 mm in Paxinos and Watson, 1982), middle (middle panel; Interaural: +1.2 mm) and rostral (right panel; Interaural: +1.7 mm). DR is divided into three distinguishable subgroups in which TPH2 mRNA levels were quantified separately: the ventromedian (VM) and the dorsomedian (DM) are present throughout the whole caudo-rostral extent of DR while Lateral groups (LAT) are in the median and rostral parts of DR. For each brain and at each time-point, TPH2 mRNA was quantified in VM and DM over 10 sections at 100 µm intervals and in 7 sections for LAT and MR.



*Figure 1: Tryptophan Hydroxylase-2 (TPH2) mRNA detection by in situ hybridization and nuclear emulsion in dorsal (DR) and median Raphe (MR). Each panel is a representative caudal, median and rostral region of DR and MR. DR is anatomically divided in ventromedian (VM) and dorsomedian (DM) and lateral (LAT) subdivisions. Scale bar: 280  $\mu$ m.*

One-way analysis of variance (ANOVA I) was conducted in order to investigate the daily variations of TPH2 mRNA levels in MR and DR subdivisions for ADX-Cort-10, SHAM and ADX-Cort-R groups. Post-hoc Newman-Keuls analysis was also performed in order to examine the significant differences between different time-points. ANOVA I with repeated measures was performed to investigate the daily variation of plasma corticosterone concentrations in all the groups.

For the locomotor activity study, actograms were analyzed using ClockLab software (Actimetrics, USA). Both daily and 6-week analysis of locomotor activity were performed. Repeated measures ANOVA I and paired student's test were respectively used to compare the daily and 6-weeks distributions of locomotor activity between CONT, SHAM and ADX-Cort-10 groups. Comparison of the mean values of TPH2 mRNA levels as well as plasma corticosterone concentrations between ZT2 and ZT10 for ADX-Cort-10, SHAM and CONT groups was assessed by using unpaired and paired student's test respectively. For all statistical procedures, the level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## ***Results***

### ***Corticosterone rhythmic secretion and TPH2 mRNA daily profiles***

#### ***Plasma Corticosterone concentrations***

In the SHAM rats, the daily profile of corticosterone concentrations exhibited the previously described pattern with increasing levels at the end of the light period (Figure 2; ANOVA I,  $P < 0.001$ ). Adrenalectomy completely suppressed the rhythmic pattern of corticosterone secretion. The constant blood concentration of this hormone measured in ADX-Cort-10 rats is resulting from the 10 % corticosterone pellets, corresponded well to the diurnal level observed in SHAM rats (figure 2; ANOVA I,  $P > 0.05$ ). In ADX-Cort-R rats, the 10% corticosterone pellet and nocturnal corticosterone intake of drinking water supplemented with 50 µg/ml corticosterone from ZT12, restored a daily pattern of plasma corticosterone level close to the SHAM group (figure 2; ANOVA I,  $P < 0.001$ ). As the hormone oral intake in ADX-Cort-R rats began at ZT12, plasma corticosterone concentrations increased as from ZT14.

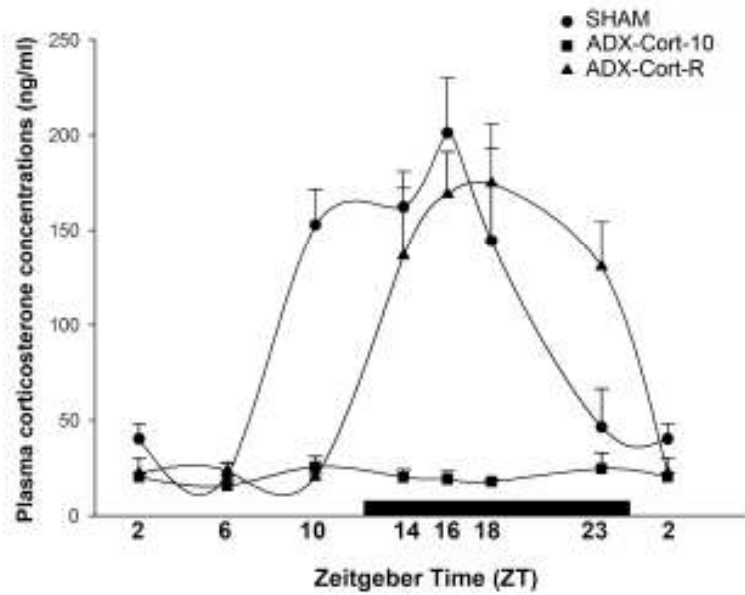
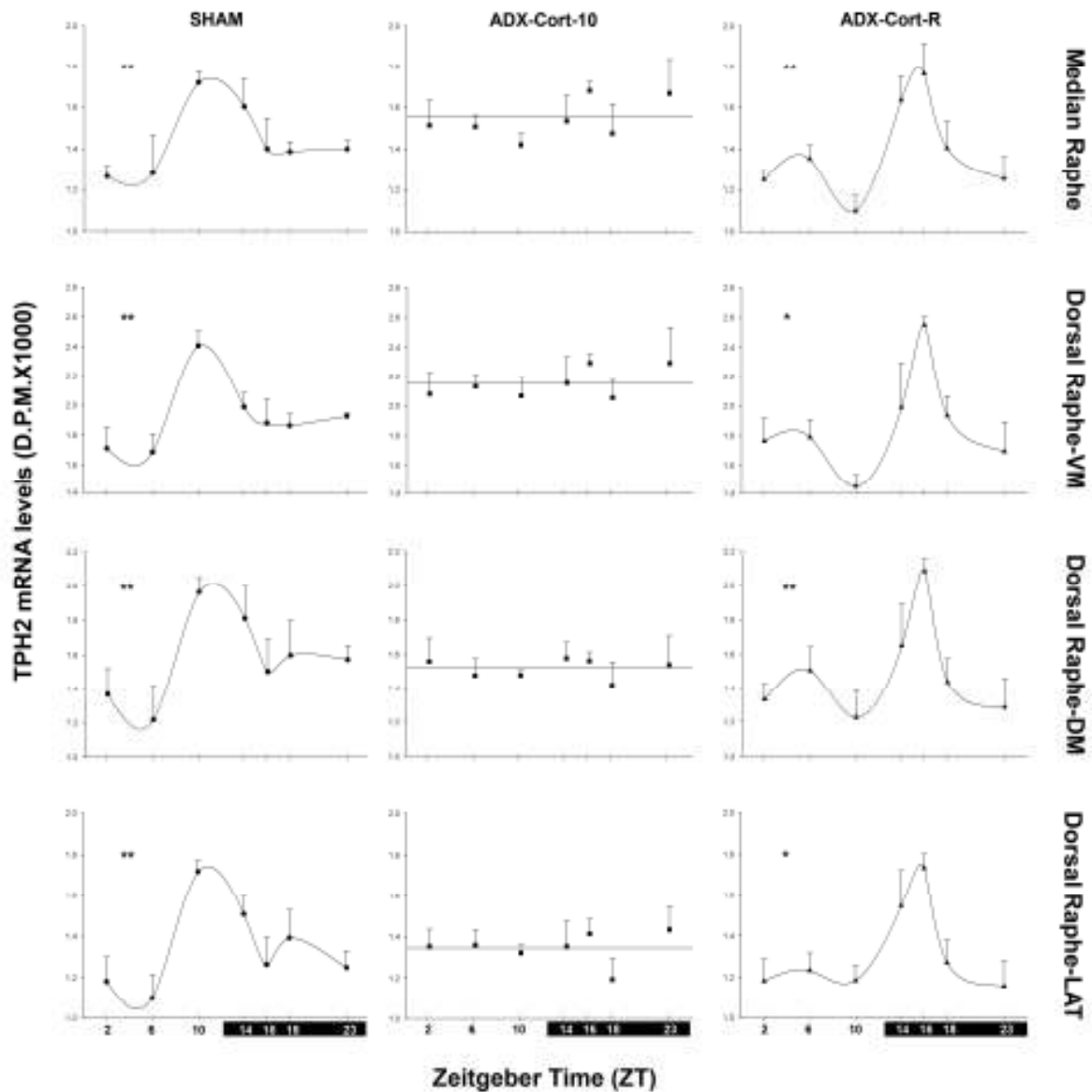


Figure 2: **Corticosterone plasma concentrations.** Daily profiles mean $\pm$ SEM of corticosterone plasma levels (ng/ml) measured by radioimmunoassay in SHAM (●; n=5), ADX-Cort-10 (■; n=6) and ADX-Cort-R (▲; n=6) rats. The black horizontal bar represents the night period. By using ANOVA I,  $P < 0.001$  for the “time-point” effect on corticosterone plasma concentrations in SHAM and ADX-Cort-R rats.

### *Effect of Corticosterone on TPH2 mRNA daily profiles*

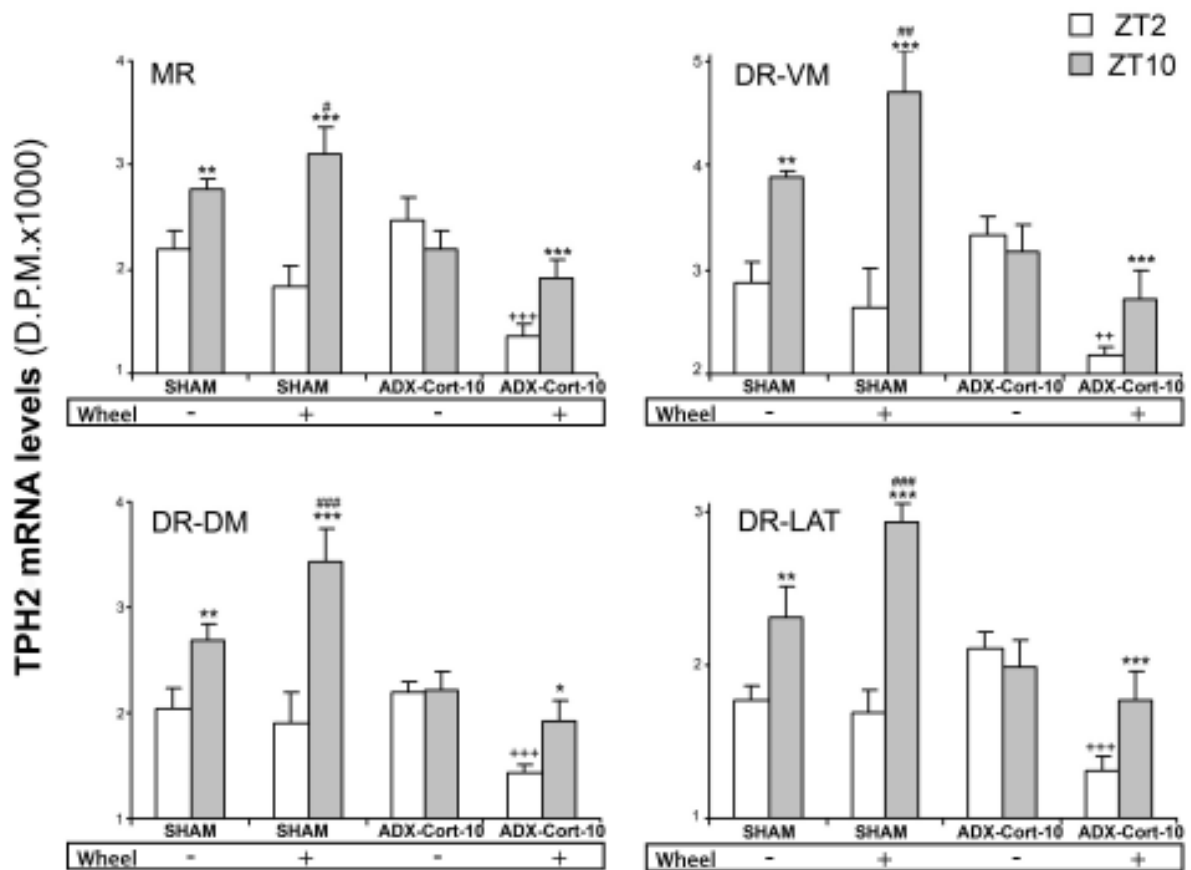
For each experimental group, TPH2 mRNA levels were quantified in MR and DR using *in situ* hybridization. In the SHAM group, TPH2 mRNA presented a rhythmic profile with increased levels at ZT10 (Figure 3; ANOVA I,  $P < 0.01$  for MR and all DR subdivisions). As compared to ZT2, TPH2 mRNA at ZT10 was increased by 36 % in MR ( $P < 0.001$ ), 41 % in VM ( $P < 0.001$ ), 44 % in DM ( $P < 0.01$ ) and 45 % in LAT ( $P < 0.001$ ). After adrenalectomy that led to the loss of corticosterone daily fluctuations, the rhythmic variation of TPH2 mRNA in MR and in all DR subdivisions was completely abolished (Figure 3; ANOVA I  $P > 0.05$ ). In contrast, in ADX-Cort-R rats for which daily plasma corticosterone level was re-established, the rhythm of TPH2 mRNA was restored (Figure 3; ANOVA I  $P < 0.05$  for VM and LAT,  $P < 0.01$  for MR and DM). The highest values of TPH2 mRNA occurred at ZT16 and at that time-point, compared to ZT2, the level was increased by 41 % in MR ( $P < 0.01$ ), 44 % in VM ( $P < 0.05$ ), 49 % in DM ( $P < 0.01$ ) and 46 % in LAT ( $P < 0.01$ ). It is noticeable that in SHAM rats, the increase of plasma corticosterone and TPH2 mRNA levels was concomitant. Plasma corticosterone and TPH2 mRNA increase was also time-related in ADX-Cort-R rats, but occurred later as corticosterone was given *via* a drinking solution after the onset of darkness.



**Figure 3: Rhythmic expression of TPH2 mRNA : effect of adrenalectomy and hormonal replacement.** Daily profiles of TPH2 mRNA levels in MR and DR subdivisions, ventromedian (VM), dorsomedian (DM) and lateral (LAT), after quantitative in situ hybridization in SHAM, ADX-Cort-10 and ADX-Cort-R rats. Each symbol is the mean  $\pm$  SEM of 4-6 rats in which TPH2 mRNA was quantified throughout the whole caudo-rostral extent of each subdivision. The black horizontal bar represents the night period. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  using ANOVA I to assess the effect of the “time-point” on TPH2 mRNA expression variation.

### ***Enhanced locomotor activity study***

The effect of enhanced locomotor activity on *tph2* gene expression was evaluated in SHAM, CONT and ADX-Cort-10 rats housed during 6 weeks in individual cages with or without a running wheel. As expected, SHAM animals housed in cages without a wheel showed the previously described (see above and Malek *et al.*, 2005) significant increase of TPH2 mRNA levels between ZT2 and ZT10 (Figure 4; t-test,  $P < 0.01$  in MR and all DR subdivisions). The percentage of this increase was 30 % in MR, 35 % in VM, 32 % in DM and 31 % in LAT. The differences in the absolute values between figures 3 and 4 are due to the fact that they were collected in two separate experiments. The percentages of variation however are in line with previous findings (Malek *et al.* 2005) and within the same range as those in the first experiment. The enhanced locomotor activity in SHAM rats (with wheel) induced over a 2-fold increase in the amplitude of ZT2/ZT10 variation of TPH2 mRNA: 70 % in MR, 79 % in both VM and DM, 74 % in LAT (Figure 4; t-test,  $P < 0.001$  for MR and all DR subdivisions). The increased amplitude of ZT2/ZT10 variation was mainly due to the up-regulation of TPH2 mRNA expression at ZT10 in SHAM animals with a running wheel (t-test, ZT10 with vs. ZT10 without a wheel:  $P < 0.05$  for MR,  $P < 0.01$  for VM and  $P < 0.001$  for DM and LAT). Indeed, no significant difference was observed in TPH2 mRNA expression in SHAM rats at ZT2 with and without a wheel (t-test,  $P > 0.05$ ). The effect of the running wheel on TPH2 mRNA expression in CONT rats was similar, at both time-points, to that reported for SHAM group (data not shown).



**Figure 4: Expression of TPH2 mRNA following six-weeks of voluntary exercise.** TPH2 mRNA levels were quantified after *in situ* hybridization in SHAM and ADX-Cort-10 rats with and without a running wheel at ZT2 (white bars) and ZT10 (gray bars). TPH2 mRNA levels were measured in MR and DR subdivisions: ventromedian (VM), dorsomedian (DM) and lateral (LAT). Each vertical bar corresponds to the mean  $\pm$  SEM of 4-6 rats. \*, # and + illustrate respectively the difference between ZT2/ZT10 in all groups, ZT10/ZT10 in SHAM groups and ZT2/ZT2 in ADX-Cort-10 groups. T-test significance was set at  $P < 0.05$  (one symbol),  $P < 0.01$  (two symbols) and  $P < 0.001$  (three symbols).

To investigate whether the effect of voluntary exercise on TPH2 mRNA expression was mediated by an increase of corticosterone secretion we measured plasma corticosterone concentrations. SHAM and CONT rats display the same range of corticosterone concentrations regardless of the presence or the absence of a wheel in the cage at both time-points ZT2 and ZT10 (Table1).



	ZT2		ZT10	
	<i>Without wheel</i>	<i>With wheel</i>	<i>Without wheel</i>	<i>With wheel</i>
<b>SHAM</b>	33±8 (n= 4)	33±4 (n= 6)	148±19 (n= 4)	130±16 (n= 7)
<b>CONT</b>	23±2 (n= 4)	36±11 (n= 4)	129±20 (n= 4)	137±28 (n= 5)

*Table 1: Plasma corticosterone concentrations of rats with or without access to a running wheel. Plasma corticosterone concentrations (ng/ml) at ZT 2 and ZT10 after blood sampling by intracarotid cannulation performed in sham-operated (SHAM) and control (CONT) rats housed with or without a running wheel. (n = number of rats at each time-point).*

In line with our first experiment, adrenalectomy abolished the ZT2/ZT10 variation of TPH2 mRNA in rats housed 6 weeks without a running wheel (Figure 4; t-test,  $P > 0.05$  for MR and DR). ADX-Cort-10 rats with access to a running wheel displayed *de novo* a significant variation of TPH2 mRNA between ZT2 and ZT10 (Figure 4; t-test,  $P < 0.001$  for MR, VM and LAT,  $P < 0.05$  for DM). The percentage of this newly induced variation between ZT2 and ZT10 was 40 % in MR, 25 % in VM and 34 % in both DM and LAT. Statistical analysis demonstrated that this variation was due to the lower level of TPH2 mRNA expression at ZT2 as compared to animals with no access to a wheel (t-test, ZT2 with vs. ZT2 without wheel:  $P < 0.001$  for MR, DM and LAT,  $P < 0.01$  for VM). Comparing TPH2 mRNA expression in ADX-Cort-10 rats at ZT10 with and without a wheel showed no significant difference (t-test,  $P > 0.05$ ).

Comparative quantification of wheel-running activity was conducted in ADX-Cort-10, SHAM and CONT rats. Intracarotid cannulation had no effect on the rhythm of running wheel activity (data not shown). The clear day/night organization of wheel locomotor activity was similar in all experimental groups (Figure 5A-B). However, when considering the 6-week duration of the experiment, adrenalectomy induced a significant decrease of wheel-running activity, which is the result of a reduction of the nocturnal activity in ADX-Cort-10 rats (t-test,  $P < 0.01$ ). A week-by-week analysis of the wheel-running activity (figure 6) highlights the higher level in SHAM rats as compared to ADX-Cort-10 during the first four weeks (ANOVA I,  $P < 0.001$  for weeks 1, 2, 3 and 4). By the end of week 6, both groups showed the same level of wheel-running activity (figure 6 ANOVA I,  $P > 0.05$  for weeks 5 and 6). Rats in CONT group exhibited the same pattern of locomotor activity described for SHAM rats (data not shown).

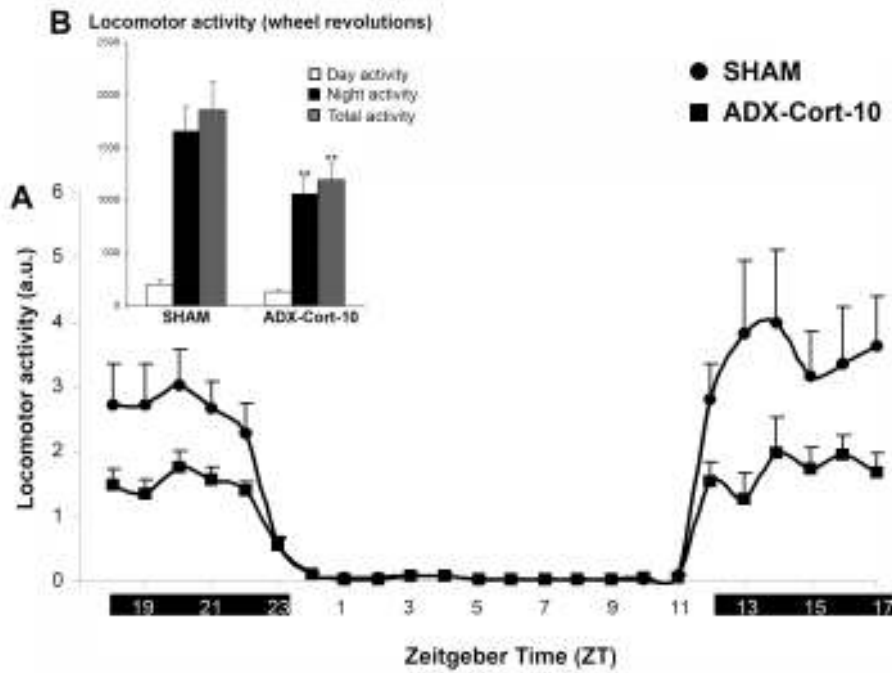


Figure 5: *Wheel-running activity of SHAM and ADX-Cort-10 rats. (A) Daily organization of running activity during 6 weeks in SHAM (●, n=11) and ADX-Cort-10 (■, n=12) rats. Each symbol is the mean value over 6 weeks and the black bar represents the night period. (B) The mean locomotor activity during day (white), night (black) and total (gray, ie sum of day + night activity) measured as the number of wheel revolutions in the SHAM and ADX-Cort-10 rats. Using t-test, \*\*  $P < 0.01$  for the effect of adrenalectomy on night and total locomotor activity.*

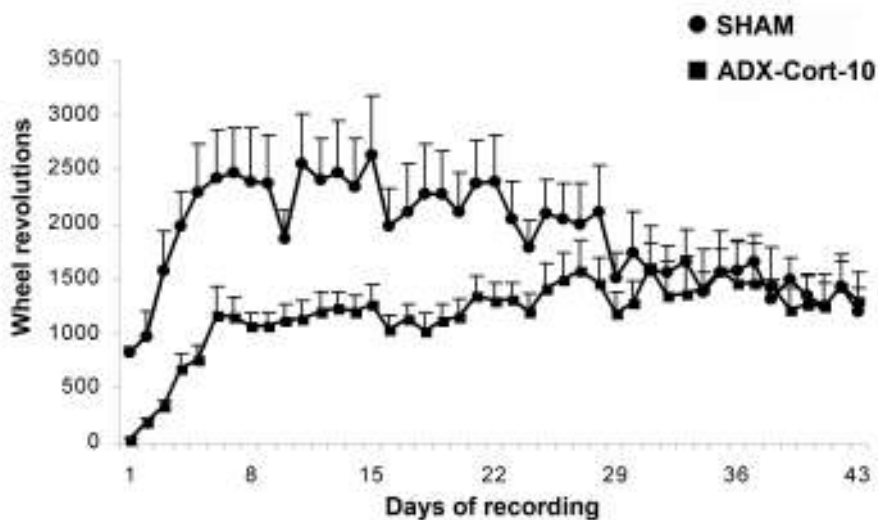


Figure 6: *Week-by-week analysis of the wheel-running activity of SHAM and ADX-Cort-10 rats. Amount of wheel-running activity in the same animals showed in figure 5 across the 6-week period of the experiment. Using ANOVA I,  $P < 0.001$  for the difference between SHAM and ADX-Cort-10 animals during the first 4 weeks.*

## ***Discussion***

In the present study, we evaluate the capacity of two SCN-controlled rhythmic cues, corticosterone and enhanced locomotor activity, to regulate the daily variation of TPH2 mRNA in Raphe nuclei. We demonstrate for the first time the involvement of these hormonal and behavioral cues in the rhythmic expression of TPH2 mRNA in DR and MR. Furthermore, our experimental paradigm enables us to dissociate the effect of both parameters, which modulate TPH2 mRNA expression in a different way.

### ***Corticosterone effect on tph2 expression***

The present study demonstrates that the corticosterone daily pattern is responsible for the rhythm of TPH2 mRNA in the rat DR and MR. TPH2 mRNA exhibited a daily rhythmic expression in all DR subdivisions and MR, as previously described (Malek *et al.*, 2005). After adrenalectomy, TPH2 mRNA is expressed at a constant level through 24 hr in DR and MR, suggesting that corticosterone surge might drive the rhythmic pattern of TPH2 mRNA. This issue is further confirmed by the fact that the TPH2 mRNA daily pattern is fully restored in ADX-Cort-10 rats after addition of corticosterone in the drinking water during night (a manipulation that reinstates the daily rhythm of corticosterone). Furthermore, our results clearly demonstrate that plasma corticosterone and TPH2 mRNA rhythms are time-related because a concomitant increase of both parameters is observed in SHAM as well as in ADX-Cort-R rats. Altogether, these results clearly establish the role of the daily corticosterone fluctuations in the rhythmic pattern of TPH2 mRNA in the Raphe.

Earlier studies have shown that 5-HT neurons are sensitive to glucocorticoids, and that this hormone modulates intrinsic factors of 5-HT synthesis (Singh *et al.*, 1990a; Azmitia *et al.*, 1993; Clark and Russo, 1997; Chamas *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2005). However, regarding TPH mRNA expression, reports are conflicting with either increase, decrease or no change after glucocorticoids treatment, immobilization or social stress (Clark and Russo, 1997; Chamas *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005; Abumaria *et al.*, 2006a). The fact that in these earlier studies the rhythmic pattern of both TPH mRNA expression and endogenous glucocorticoids were not considered can explain to some extent these discrepancies. It should also not be forgotten that until recently, only the non-neuronal *tph1* gene expression was considered, *tph2* being poorly documented. The present study is the

first, to our knowledge, which investigates through the 24h cycle the effect of endogenous corticoid fluctuation on TPH2 mRNA.

The mechanisms involved in corticosterone induction of TPH2 mRNA circadian expression are not known. An indirect action of corticoids, for example *via* glucocorticoid-sensitive brain areas projecting to the Raphe nuclei cannot be excluded. For example, noradrenaline (NA) neurons of the Locus Cœruleus are sensitive to corticoids (Makino *et al.*, 2002) and are responsible for a tonic NA input to the 5-HT neurons (Gallager and Aghajanian, 1976b; Baraban and Aghajanian, 1980). NA through actions on NA-receptors modulates the firing rate of 5-HT neurons as well as 5-HT synthesis and release (Baraban and Aghajanian, 1980; Esteban *et al.*, 1996; Pudovkina *et al.*, 2003). A direct action of corticosterone on 5-HT neurons remains however the most expected hypothesis. Corticosterone acts through glucocorticoids (GR) or mineralocorticoid receptors. The involvement of mineralocorticoid receptors in this response is unlikely because these receptors are not present in Raphe nuclei (Ahima *et al.*, 1991). GR at the opposite have been demonstrated to be co-expressed with 5-HT and TPH in Raphe neurons (Härfstrand *et al.*, 1986; Malek *et al.*, 2006). Generally speaking, it is known that to act upon gene expression, corticoids are subordinated to a dynamic regulation of both GR and its principal intracellular chaperone, heat-shock protein (HSP) 90. To determine if the same mechanism takes place in the control of the rhythmic expression of *tph2* gene, it would be necessary to investigate whether the expression of GR-HSP90 complex is also rhythmic in the 5-HT Raphe neurons. This is likely since it has already been described in hippocampus (Furay *et al.*, 2006), but remains to be demonstrated in Raphe neurons. The effect of corticoids on *tph2* gene expression might also affect post-transcriptional processing and mRNA stability as previously described for other genes (for review see Ing, 2005).

In the context of circadian functions, previous reports have demonstrated that corticosterone daily rhythm acts as a temporal signal able to sustain the expression of numerous rhythmic genes (Holmes *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998; Amir *et al.*, 2004; Segall *et al.*, 2006). Our present data also demonstrate that corticoids induce the daily TPH2 mRNA expression. Although the present work describes the action of corticoids only at the mRNA level, our previous studies have established a temporal relationship between TPH2 mRNA, protein and neurotransmitter release, at least in the MR-SCN pathway (Barassin *et al.*, 2002; Malek *et al.*, 2004; 2005). Thus, glucocorticoids could indirectly mediate a temporal signal throughout the brain *via* the widespread 5-HT innervations. The present

findings can also explain the modulatory effect of glucocorticoids on the photic synchronization of locomotor activity reported by Sage et al. (2004). Such an effect, which cannot result from a direct effect of glucocorticoids on the SCN cells since GR are very low or absent (Balsalobre *et al.*, 2000), can be explained by an indirect effect of glucocorticoids *via* the 5-HT neurons. Indeed, the authors have reported the involvement of SCN 5-HT afferent fibers in this mechanism. Taken together, our data suggest that corticosterone circadian signal, through a direct or indirect effect on 5-HT Raphe neurons, can affect physiological, behavioral or emotional functions which are dependent of brain structures receiving 5-HT fibers.

### ***Effect of enhanced locomotor activity on tph2 expression***

Six weeks with access to a running wheel induces roughly a 2 fold increase in TPH2 mRNA levels in DR and MR at ZT10 in SHAM and CONT rats. The same voluntary exercise has previously been shown to influence the serotonergic transmission. After 6 weeks with a running wheel, for example, modifications of the 5-HT transporter and 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA levels have been reported within the DR and MR (Greenwood *et al.*, 2005). The same group (Foley *et al.*, 2006) however, described that TPH2 mRNA expression was unaffected by enhanced locomotor activity, an observation that apparently contradicts our results. This is only apparent contradiction. Indeed, Foley et al. (2006) used rats killed during the morning, corresponding to our experimental time-point ZT2 (10h a.m.) at which we report no differences in *tph2* gene expression either. It is the analysis at different periods of the light/dark cycle which allowed us to detect this difference between the animals with and without a running wheel.

We had initially postulated that the 2-fold increase in TPH2 mRNA might be the consequence of an increase of plasma corticoids induced by enhanced locomotor activity. However, at the end of the 6 weeks, plasma corticosterone concentrations were similar in rats with and without a running wheel which is in agreement with a previous study demonstrating that after 4 weeks of voluntary exercise, a normal daily range of corticosterone level is already restored (Fediuc *et al.*, 2006). Therefore the up-regulation of TPH2 mRNA expression observed at ZT10 after 6 weeks of access to a running wheel might not be related to an increase of corticoid levels. Since long-term enhanced activity might induce modifications of GR expression and/or sensitivity, a role of this hormone cannot be totally excluded. Some previous data already suggested that *tph* gene expression can be modified by a glucocorticoids

independent mechanism (Clark and Russo, 1997; Chamas *et al.*, 2004). Our present study also demonstrates that enhanced locomotor activity is effective in modifying the level of TPH2 mRNA expression even in ADX-Cort-10 rats and interestingly the observed ZT2/ZT10 variation of TPH2 mRNA expression in ADX-Cort-10 rats is the consequence of a decrease at ZT2. It might be suggested that the different effect observed at ZT2 between SHAM and ADX-Cort-10 rats is the consequence of a phase-shift of the rhythmic expression of TPH2 mRNA in ADX-Cort-10 rats with a running wheel. This is unlikely because at the behavioral level, adrenalectomy had no influence on the rhythmic organization of the daily locomotor activity. The locomotor activity effect on TPH2 mRNA levels appears to be complex and is triggered by a mechanism which is corticoid independent.

In conclusion, our results demonstrate the involvement of two different rhythmic outputs of the SCN, namely corticosterone daily surge and locomotor activity, in the regulation of the circadian profile of *tph2* gene expression in DR and MR. Corticosterone daily fluctuations control the rhythmic expression of TPH2 mRNA levels and the enhanced locomotor activity acts to modulate the level of TPH2 mRNA in the Raphe. The serotonergic input to the SCN might be considered as an intermediate target for both endocrine and behavioral feedback on the clock itself. This effect might be considered in a more general context in which the common 5-HT projection areas in the brain would also provide a time-related signal over a 24-hour cycle.

### ***Acknowledgements***

We thank Daniel Bonn for taking care of the animals and Dr S. Reibel for english revision of the manuscript. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, the ACI “Plates-formes d’explorations fonctionnelles thématiques” from the Ministère Délégué à la Recherche.



**Chapitre IV : Variations photopériodiques de  
l'expression du gène *tryptophane hydroxylase-2*  
chez le Rat**





Dans leur milieu naturel, les organismes doivent faire face aux variations saisonnières de l'environnement telles que les variations de luminosité, de température ou même de disponibilité alimentaire. Pour survivre, les espèces doivent développer des stratégies adaptatives et se situer dans le temps annuel pour anticiper les changements saisonniers de l'environnement. De la sorte, les fonctions physiologiques et comportementales vont présenter des variations périodiques synchronisées par la photopériode, qui correspond à la durée de la phase lumineuse par 24 h.

La reproduction est la fonction saisonnière la plus étudiée pour illustrer les relations qui peuvent exister entre la photopériode et les activités physiologiques annuelles. Ainsi, la plupart des animaux ont un cycle annuel de reproduction, et les naissances ont lieu à un moment où les conditions climatiques et trophiques sont les plus adaptées pour la survie des petits. En photopériode courte, le Hamster syrien, un rongeur saisonnier, présente une régression testiculaire et devient ainsi sexuellement inactif ; la reprise de l'activité sexuelle est, par contre, spontanée et survient après environ 20 semaines en photopériode courte.

Des expériences de lésions ont révélé que l'ablation des SCN chez le Hamster syrien sexuellement actif induit une suppression de la régression testiculaire lorsqu'il est transféré en photopériode courte (Rusak & Morin, 1976). Les SCN sont sensibles à la photopériode, ceci se manifeste aussi bien sur le plan électrique que moléculaire. En effet, la durée du pic d'activité électrique des neurones des SCN enregistrés *in vitro* est influencée par la photopériode dans laquelle l'animal était placé (Mrugala *et al.*, 2000 ; Schaap *et al.*, 2003 ; Vanderleest *et al.*, 2007). L'expression des gènes de l'horloge dans les SCN est également modifiée en fonction de la durée de la photopériode chez le Rat (Sumova *et al.*, 2003) et le Hamster (syrien : Tournier *et al.*, 2003 et sibérien : Johnston *et al.*, 2005). De plus, l'expression d'un gène contrôlé par l'horloge, celui codant la VP, est modifiée par les variations de la photopériode (Duncan *et al.*, 1995 ; Jac *et al.*, 2000 ; Johnston *et al.*, 2005).

Sur le plan endocrine, la sécrétion de la mélatonine par la glande pinéale constitue l'une des principales sorties photopériodiques de l'horloge (pour revue voir Pévet *et al.*, 1997). Les variations photopériodiques de sécrétion de mélatonine existent chez des espèces saisonnières telles que le Hamster (Arendt, 1998), mais aussi chez le Rat (Ribelayga *et al.*, 1999). Les variations de la durée de sécrétion de mélatonine en fonction de la photopériode permettent de contrôler notamment la sécrétion saisonnière de prolactine par la *pars distalis*

de l'andénohypophyse (Lincoln & Clarke, 1994). Un autre messager hormonal, la corticostérone dont la sécrétion varie en fonction de la photopériode chez le Rat (Ahlersova *et al.*, 1992 ; Tritschler *et al.*, travaux non publiés) pourrait être considérée comme une sortie photopériodique de l'horloge et serait impliquée dans la distribution du message saisonnier vers les structures cibles.

Nous avons mis en évidence des variations circadiennes de la protéine TPH et de l'ARNm TPH2 dans les neurones sérotoninergiques du RD et du RM, reflétant ainsi l'existence, dans ces neurones, d'une synthèse circadienne de 5-HT qui est contrôlée par l'horloge principale. Les variations photopériodiques, intégrées par les SCN, peuvent également influencer le fonctionnement des neurones sérotoninergiques en modulant la synthèse de 5-HT *via* une (ou plusieurs) sortie photopériodique.

**Dans ce chapitre, nous avons quantifié les profils journaliers de l'ARNm de la TPH2 dans le RM et le RD chez des Rats placés dans deux conditions photopériodiques : une photopériode longue, correspondant à 18 h de lumière et à 6 h d'obscurité (18:6) et une photopériode courte (6:18).**

# **Photoperiod regulates the daily profiles of *Tryptophan Hydroxylase-2* gene expression the raphe nuclei of rats**

**Zeina S. MALEK, Paul PEVET and Sylvie RAISON**

**Under preparation**

## ***Abstract***

Tryptophan hydroxylase-2 mRNA (TPH, the rate limiting enzyme in 5-HT synthesis) expression levels display circadian variations in the median and dorsal raphe nuclei. This circadian pattern is under the control of the suprachiasmatic nuclei (SCN), the master clock. Photoperiodic cue is encoded by the SCN which convey the seasonal message to target sites. In the present study, we have investigated the effect of photoperiodic changes on the serotonergic neurones of the raphe nuclei. We have assessed the daily expression of TPH2 mRNA in both median and dorsal raphe nuclei of rats housed either under long photoperiod (18 h light/6 h dark cycle, LP18:6) or short photoperiod (SP6:18). Our results demonstrate that under LP18:6, TPH2 mRNA levels display a progressive decrease during the dark period and a maximal expression is reported at the beginning of the light period. The expression pattern of TPH2 mRNA under SP6:18 remains unchanged during the dark period and increases significantly before the day/night transition. This latter expression pattern is in line with the daily profiles of TPH2 mRNA reported previously under standard lighting regimen (12 h light/12 h dark cycle). The present results suggest that TPH2 mRNA expression pattern within DR and MR is affected by photoperiod which might in turn affect TPH content and 5-HT release within the circadian structures, but also in all the serotonergic projection areas of the brain.

## ***Introduction***

Serotonin (5-HT) is involved in both photic and non-photic resetting of the central circadian pacemaker residing in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus (Morin, 1999; Yannielli & Harrington, 2004). A direct serotonergic afferent pathway to the SCN arises from the median raphe nucleus (MR), whereas the dorsal raphe nucleus (DR) projects indirectly to the SCN through the thalamic intergeniculate leaflets (IGL, Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Hay-Schmidt *et al.*, 2003). Both Tryptophan hydroxylase (TPH, the rate limiting enzyme in 5-HT synthesis) content and 5-HT release display circadian variations within the serotonergic fibres in the SCN of rat (Barassin *et al.*, 2002). Furthermore, TPH protein and TPH2 mRNA (encoded by the neuronal *tph* gene: *tph2*) levels undergo circadian variations in both DR and MR (Malek *et al.*, 2004; 2005). The circadian pattern of TPH2 mRNA expression has been shown to be directly controlled by corticosterone daily surge, a neuroendocrine output of the clock (Malek *et al.*, submitted).

While several features of serotonergic neurones have been characterised, the impact of photoperiod (the annual change in the day length) on the general functioning of these neurones is poorly investigated. Indeed, little is known about the photoperiodic-related changes in the synthesis and the release of 5-HT within the time-keeping system. For instance, the rhythmic release of 5-HT in the SCN and the IGL of golden and siberian hamsters was only investigated under long photoperiod (Glass *et al.*, 1992; Dudley *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2004). On the other hand, among the studies performed in rats, the intra-SCN 5-HT release was only examined under 12 h light:12 h dark cycle (LD12:12; Barassin *et al.*, 2002). Furthermore, to our best knowledge, the photoperiodic regulation of the daily pattern of TPH protein and TPH2 mRNA has never been studied.

Photoperiodic information is encoded by the SCN clock which displays photoperiod-related changes in its electrical activity (Mrugala *et al.*, 2000; Vanderleest *et al.*, 2007) and genes expression (Sumova *et al.*, 2003; Tournier *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2005). The circadian pacemaker distributes the photoperiodic message to the target sites *via* several endocrine outputs. Melatonin secretion is one of these outputs and is considered as an internal message that ensures seasonal timing (Simonneaux & Ribelayga, 2003). In addition, daily secretion of corticosterone is affected by the day-length in rats housed under short and long photoperiod (Ahlersova *et al.*, 1992; Trischler *et al.*, unpublished) and could therefore carry photoperiodic changes to glucocorticoids sensitive neurones.

The present study was designed in order to investigate whether the photoperiodic environment could influence the functioning of the serotonergic neurones in the DR and the MR. Thus, we have assessed the daily expression of TPH2 mRNA in both raphe nuclei of rats housed either under long or short photoperiod.

## ***Materiel and methods***

### ***Animals***

All experiments were performed in accordance with NIH Guidelines regarding the care of laboratory animals, with the *European Communities Council Directive* of 24 November 1986 (86/6.9/EEC) and the French laws. Adult male Wistar rats weighing 180-200 g were purchased from the faculty of medicine in Strasbourg (France) and kept in animal's facilities one week for acclimation. Animals were then divided into two groups: the first placed under long photoperiod which corresponds to 18 h light and 6 h dark cycle (LP18:6, lights on from 05h00 until 23h00). The second group was transferred into short photoperiod (SP6:18, lights on from 14h00 until 20h00). Animals had free access to food and water during the experiment. Rats in both groups were kept 4 weeks under LP or SP conditions and then killed by decapitation at seven time-points across the day/night cycle. Four animals were killed at each of the following time points: 24h00, 02h00, 04h00, 09h00, 13h00, 17h00 and 21h00 for the LP group and 21h00, 23h00, 02h00, 06h00, 10h00, 13h00 and 18h00 for the SP group. Brains were quickly removed, frozen in cold isopentane and stored at -80°C until tissue preparation. Trunk blood was collected into heparinized tubes and centrifuged (2800 rpm at 4°C) and the resulting serum was used for melatonin radioimmunoassay in order to confirm the integration of the photoperiodic change.

### ***In situ hybridisation procedure***

Brains were cut in serial coronal sections (20 µm thick) with a cryostat (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) throughout the rostral part of the Raphe, including DR and MR (Interaural from +1.9 mm to +0.7 mm, Paxinos and Watson, 1982) and collected on gelatine-coated slides.

For *in situ* hybridisation, sense and antisense riboprobes for TPH2 were prepared as described previously (Malek *et al.*, 2005) by using the corresponding linearized plasmids and

the appropriate polymerase (MAXI script, Ambion, USA) in presence of [35S]-UTP (1250 Ci/mmol, Amersham, UK).

Hybridisation was performed as following: sections were postfixed in 4% formaldehyde and then acetylated twice in triethanolamine (0.1 M, pH 8.0) with 0.5 % acetic anhydride. Thereafter, sections were rinsed, dehydrated in graded ethanol and air-dried. Hybridisation was carried out at 54°C overnight in humid boxes by depositing 100 µl of TPH2 riboprobes (300 pM). The hybridisation solution contained 50 % deionised formamide, 2X sodium saline citrate (SSC), 1X Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 1 mg/ml salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate and 10 mM dithiothreitol. After hybridisation, the sections were treated with Ribonuclease A at 37°C (1.4 µg/ml, Sigma, USA). Stringency washes were then performed in 4X SSC, 2X SSC, 0.5X SSC and 0.2 X SSC. Finally, sections were dehydrated in graded ethanol, air-dried and exposed for 24 h to an autoradiographic film (Kodak BioMax).

### ***Melatonin radioimmunoassay***

Melatonin was extracted from plasma samples using dichloromethane and assessed in duplicates using a specific rabbit antiserum at 1:90 000 (R 19540, INRA, Nouzilly, France) and [<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin. Melatonin assay detected values as low as 5 pg/ml and the reproducibility of the method was determined by evaluating the INTRA-assay variation (2.5%) and the INTER-assay variation (6.5%).

### ***Quantification procedure and statistical analysis***

Quantitative analysis of the autoradiographic films was performed using a computerized analysis system (Biocom-program RAG 200). Total optical density (OD) was measured for each region of interest (MR, DR). The surface of each region was measured and the area of TPH2 mRNA expression was found to be comparable between the experimental groups. Non-specific OD was measured for each section within mesencephalic areas where TPH2 mRNA is not expressed, and then subtracted from total OD. By reference to radioactive microscapes, OD was converted to relative levels of mRNA. DR is divided into three distinguishable subgroups in which TPH2 mRNA levels were quantified separately: Ventromedial (VM), Dorsomedial (DM) and Lateral (LAT).

One-way analysis of variance (ANOVA I, time as factor) was conducted in order to examine the daily variation of melatonin plasma levels and TPH2 mRNA expression in the

MR and all the DR subdivisions for both LP and SP animals and was followed by a Post-Hoc Newman-Keuls analysis. On the other hand, two-way analysis of variance (ANOVA II, photoperiodic condition and time as factors) and Newman-Keuls analysis were performed to compare the daily profiles of TPH2 mRNA between LP and SP condition. For all statistical procedures, the level of significance was set at  $P<0.05$ .

## Results

### Plasma melatonin concentrations

Plasma melatonin concentrations display marked daily variations under both LP and SP conditions (Figure 1,  $P<0.001$  for LP and  $P<0.01$  for SP). The melatonin peak is delayed with the increase of the night length. Under LP, the nocturnal rise of melatonin occurs within three hours after the lights are off (02h00) and expands on the following two hours (04h00). The nocturnal rise under SP occurs about 10 hours after the lights are off (06h00), and lasts for the rest of the night period. These profiles are in accordance with previous results obtained in the rat and confirm the integration of the photoperiodic change (Illnerova *et al.*, 1986; Ribelayga *et al.*, 1999).

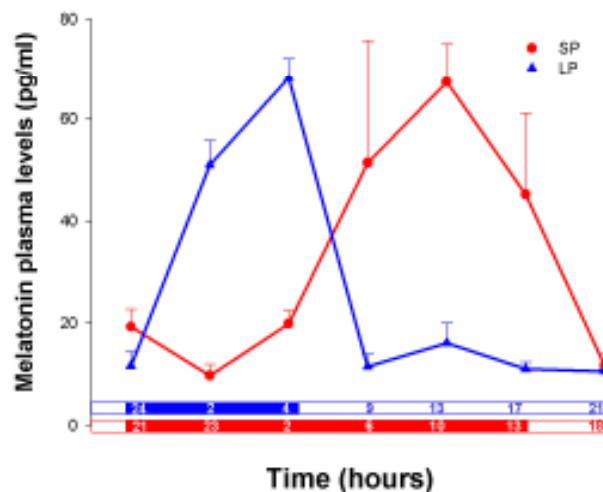


Figure 1: Daily profiles of melatonin plasma concentrations (pg/ml) measured by radioimmunoassay in rats housed under long (LP18:6, blue triangles) and short (SP6:18, red circles) photoperiods. Each symbol corresponds to the mean $\pm$ SEM of 4 rats. The black horizontal bars represent the night period. Using ANOVA I,  $P<0.001$  and  $P<0.01$  for the time effect on melatonin plasma concentrations in LP and SP rats respectively.



### ***Effect of photoperiod on TPH2 mRNA in the MR***

The daily pattern of TPH2 mRNA expression in MR of rats housed under LP and SP is presented on the Figure 2. The ANOVA I analysis reveals significant daily variation of TPH2 mRNA expression in MR under both photoperiodic conditions ( $P < 0.05$  for both LP and SP). A sharp increase (93 %) in TPH2 mRNA levels in MR is observed at the night/day transition in LP group ( $P < 0.05$  between 04h00 and 09h00). On the other hand, a significant decrease in TPH2 mRNA levels is noticed during the night under LP (24h00/04h00: -81 %,  $P < 0.05$ ). In all the daytime points, TPH2 mRNA expression exhibits no significant difference compared with 24h00. In rats of the SP group, the maximal expression levels are also observed during the day-time ( $P < 0.05$  between 13h00 and 18h00). The percentage of the increase between these two time-points is 40 %. During the dark period, TPH2 mRNA expression levels remain unchanged. Comparing the daily pattern of TPH2 mRNA in both photoperiods (ANOVA II) reveals no significant effect for time or photoperiod, though a significant interaction between both factors is observed ( $P < 0.001$ ). The latter analysis demonstrates that the daily profile of TPH2 mRNA is different between LP and SP group.

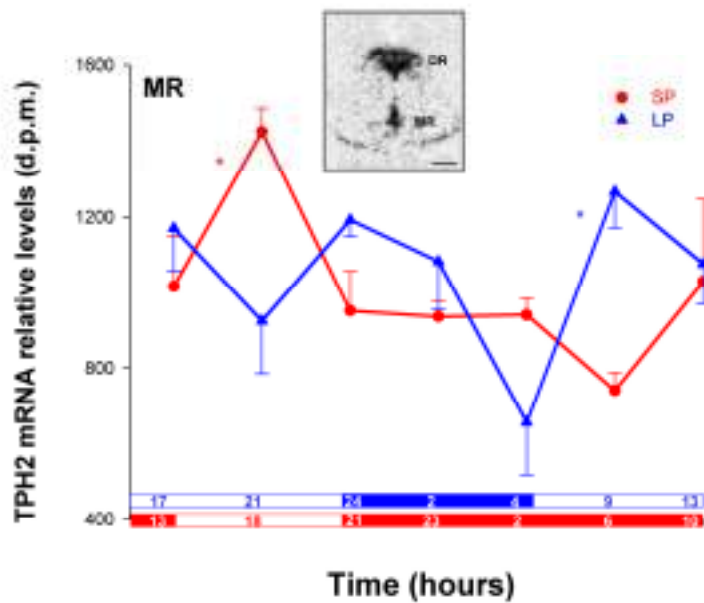


Figure 2: The daily profiles of TPH2 mRNA levels in the median raphe (MR) of rats housed under long (LP18:6, blue triangles) and short (SP6:18, red circles) photoperiods. The top panel illustrates TPH2 mRNA in situ hybridisation within the MR (scale bar: 1000  $\mu$ m). Each symbol is the mean  $\pm$  SEM of 4 rats in which TPH2 mRNA was quantified throughout the caudo-rostral extent of the MR. The black horizontal bars represent the night period. \*  $P < 0.05$ , using ANOVA I to assess the effect of the timing on the daily expression of TPH2 mRNA.

### ***Effect of photoperiod on TPH2 mRNA in the DR***

The day/night evolution of the TPH2 mRNA expression pattern in the DR subgroups is presented on the Figure 3, and is indeed quite similar to that reported in MR. TPH2 mRNA expression levels are quantified separately in each subgroup of the DR: VM, DM and LAT (Figure 3). In the DR, the expression of TPH2 mRNA displays significant daily variations under LP ( $P<0.05$  for VM,  $P<0.01$  for DM and LAT) and SP ( $P<0.01$  for VM and LAT,  $P<0.05$  for DM). A marked increase of TPH2 mRNA expression occurs between 04h00 and 09h00 under LP condition in the DR (90 % for VM, 100 % for DM and 92 % for LAT,  $P<0.01$  for all the subgroup). Under the same photoperiod, a significant nocturnal decrease of TPH2 mRNA levels is observed between 24h00 and 04h00 for VM (-79 %,  $P<0.05$ ) and LAT (-78 %,  $P<0.01$ ). In the DM, however, this decrease (-66 %) fails to reach the significance limit. No significant differences are noted between 24h00 and other daytime points in all DR subgroups. Under SP, the highest levels of TPH2 mRNA are reported at 18h00 ( $P<0.05$  for VM and DM and  $P<0.01$  for LAT, between 13h00 and 18h00). The percentage of the 13h00/18h00 increase is 38 % for VM, 33 % for LAT and 52 % for DM. For all nighttime points, TPH2 mRNA expression levels are unchanged. The statistical comparison of TPH2 mRNA daily profiles between LP and SP condition in DR showed no significant differences in either time, except for VM ( $P<0.001$ ), or photoperiod. The interaction between both factors is however significant ( $P<0.01$  for VM,  $P<0.001$  for DM and LAT), which demonstrate that the daily pattern of TPH2 mRNA expression is different with respect to the photoperiod.

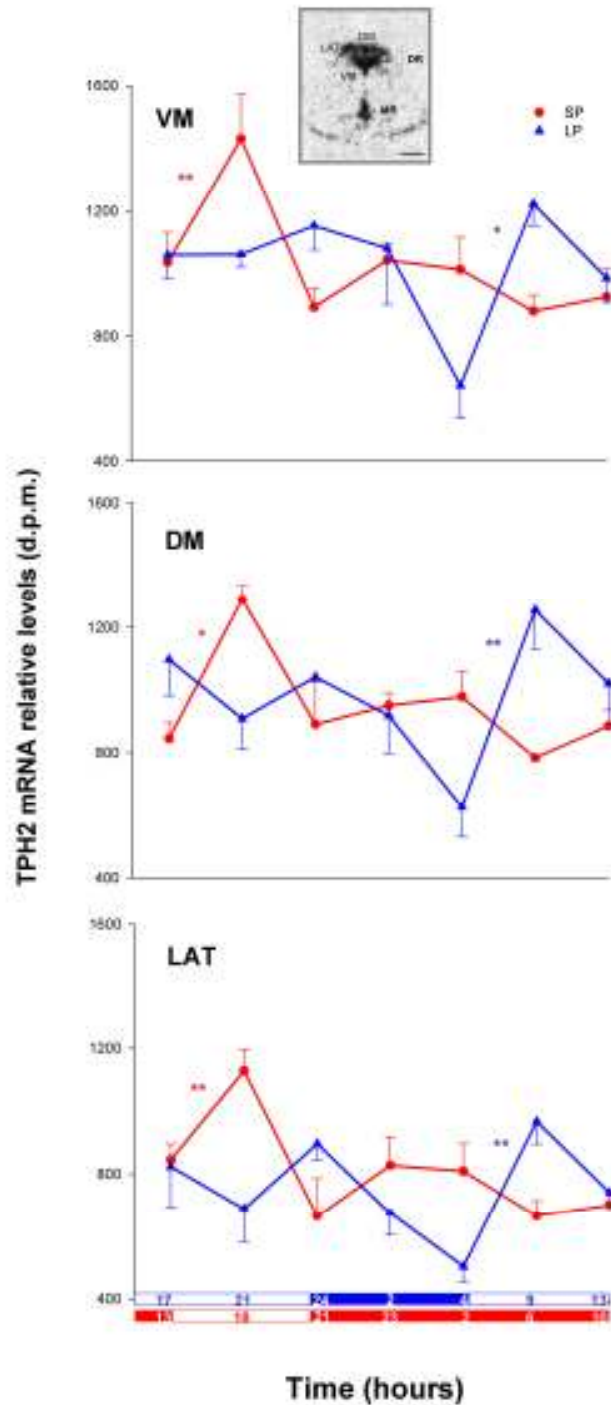


Figure 3: TPH2 mRNA relative levels in the dorsal raphe (DR) subdivisions; ventromedian (VM), dorsomedian (DM) and lateral (LAT) of rats housed under long (LP18:6, blue triangles) and short (SP6:18, red circles) photoperiods. The anatomical subgroups of the DR are illustrated using TPH2 mRNA in situ hybridisation (the top panel, scale bar: 1000  $\mu$ m). Each symbol is the mean  $\pm$  SEM of 4 rats in which TPH2 mRNA was quantified throughout the caudo-rostral extent of each subdivision. The black horizontal bars represent the night period. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , using ANOVA I to assess the effect of the timing on the daily expression of TPH2 mRNA.

## ***Discussion***

To our knowledge, this is the first evidence for photoperiod-related changes in the daily pattern of the *tph2* gene expression in rats. Under standard lighting conditions (i.e. LD12:12), TPH2 mRNA undergoes rhythmic expression and the higher levels are observed 2 hours before the day/night transition in both raphe nuclei (Malek *et al.*, 2005). In this study, we report a similar expression pattern under SP8:16, where TPH2 mRNA levels peak at 18h00 (lights off at 20h00) in both MR and DR. This is however different to that in LP group, for which TPH2 mRNA levels peak at the beginning of the light period and are unaffected by the day/night transition. Under both photoperiodic conditions, TPH2 mRNA levels increase with the lights on, which might reflect an effect of the light onset on its expression. Previous tract tracing studies have described the presence of retinal input to the DR, suggesting that 5-HT neurones can receive the light/dark information (Shen & Semba, 1994 ; Fite *et al.*, 1999). The effect of light on TPH2 mRNA expression needs to be further investigated. It is noteworthy that the daily pattern of TPH2 mRNA under LP tends to be bimodal, because the expression levels display a marked nocturnal decrease in DR and MR before the peak at the beginning of the light period. This bimodal pattern is however not evident in VM and DM, and the nocturnal decrease of TPH2 mRNA levels in the latter subgroup is not significant. A bimodal pattern in serotonergic neurones has been previously reported in rats under LD12:12 conditions concerning 5-HT content in the raphe (Pinato *et al.*, 2004) as well as TPH protein content in the SCN (Barassin *et al.*, 2002). However, in the latter study, the bimodal pattern was not found in the daily profile of 5-HT release in the SCN, which displays a single peak at the beginning of the dark period.

In our previous studies, we have described a temporal relationship between TPH2 mRNA, TPH protein and 5-HT release in the rat circadian system under standard lighting condition. Indeed, these three parameters display rhythmic and time-related variations under LD12:12 cycle. The circadian variations of TPH2 mRNA in the DR and MR are found at the protein level in the same nuclei, as well as in the 5-HT terminals within the SCN and the IGL (Barassin *et al.*, 2002; Malek *et al.*, 2004; 2005). Furthermore, 5-HT release is rhythmic in the SCN (Barassin *et al.*, 2002) and the IGL (Grossman *et al.*, 2004). Herein, we demonstrate a differential daily pattern of TPH2 mRNA expression in both DR and MR with respect to photoperiodic environment. It could be suggested that the rhythmic patterns of TPH protein levels and 5-HT release would display photoperiod-related changes within both RD→IGL

and RM→SCN pathways. Further experiments should be done in order to confirm such hypothesis.

We have previously demonstrated that TPH2 mRNA expression under constant darkness condition displays significant variations that are similar to those observed under LD12:12, indicating a circadian regulation of this expression (Malek *et al.*, 2005). This later result confirms that TPH2 mRNA daily pattern is under the SCN clock control. Indeed, under LD12:12, the rhythmic expression of TPH2 mRNA has been shown to be controlled by glucocorticoids, one of the endocrine outputs of the SCN central pacemaker. The abolishment of corticosterone surge by adrenalectomy results in a complete suppression of TPH2 mRNA rhythm, which can be reinstated using a paradigm of rhythmic replacement of corticosterone (Malek *et al.*, submitted). In rats, the daily secretion of corticosterone is affected by the day-length (Ahlersova *et al.*, 1992; Trischler *et al.*, unpublished) and could thereby provide an internal signal not only for the circadian time, but also for the seasonal time. The photoperiod-related changes in TPH2 mRNA daily rhythm described in the present study might thus be driven by glucocorticoids. To further confirm the involvement of corticosterone, it would be relevant to examine the effect of photoperiodic restitution of corticosterone on the TPH2 mRNA daily expression in adrenalectomised rats housed under both photoperiodic regimens. Furthermore, we can investigate the influence of photoperiodic changes upon GR expression levels within both DR and MR, in order to assess whether the sensitivity of the serotonergic neurones to corticosterone is modified according to the photoperiod.

Melatonin secretion is a seasonal output of the SCN known to drive photoperiodic message. Indeed, the duration of the nocturnal melatonin secretion is proportional to the length of darkness, providing an internal signal for seasonal changes (Simonneaux & Ribelayga, 2003). A main target tissue of this seasonal signal in mammals is the hypophyseal *pars tuberalis* in which melatonin has been shown to be a key regulator of clock genes expression (Messenger *et al.*, 1999; Dardente *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2007). Melatonin could also be involved, as a seasonal signal, in the photoperiodic changes of TPH2 mRNA daily rhythm reported in the present study. Although melatonin receptors have not been identified in the raphe neurones (Masson-Pevet *et al.*, 1994), this hormone has been shown to modulate 5-HT synthesis in the SCN (Miguez *et al.*, 1996). It can be suggested that melatonin would act indirectly upon the serotonergic neurones *via* melatonin-sensitive brain areas. Further experiments are needed to investigate the influence of melatonin on the photoperiodic related changes of TPH2 mRNA rhythmic expression.

Overall our results lead us to conclude that the raphe serotonergic neurones are sensitive to changes in the photoperiodic environment. The daily pattern of TPH2 mRNA is affected by these changes, which might influence TPH protein levels and 5-HT release within the SCN. If so, the involvement of the serotonergic system in the photoperiodic time measurement should be further considered. Moreover, photoperiodic changes in 5-HT release within the SCN, and elsewhere in the brain, would reflect the involvement of the serotonergic system in seasonal affective disorder.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**





## **A. Fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL**

Nous avons examiné le fonctionnement des neurones sérotoninergiques du RD et du RM en étudiant, en fonction du cycle circadien, deux paramètres spécifiques de ces neurones et intervenant dans la régulation de la synthèse de 5-HT : l'ARNm de la TPH2 et la protéine TPH.

Ainsi, nous avons montré, pour la première fois, que ces deux paramètres présentent des niveaux d'expression rythmiques en cycle LD12:12 dans les neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL. En condition d'obscurité constante, les profils rythmiques de ces deux paramètres sont maintenus, permettant ainsi de confirmer leur nature circadienne. En accord avec nos résultats, des études ont évalué l'activité enzymatique de la TPH, un autre paramètre contrôlant la synthèse de 5-HT, et ont montré que cette activité varie également dans les SCN et les noyaux du Raphé (Kan *et al.*, 1977 ; Natali *et al.*, 1980 ; Poncet *et al.*, 1993). Les variations des différents paramètres qui contrôlent la synthèse de 5-HT sont corrélées avec une libération rythmique du neurotransmetteur dans les SCN (Glass *et al.*, 1992 ; Dudley *et al.*, 1998 ; Barassin *et al.*, 2002) et les IGL (Grossman *et al.*, 2004).

L'analyse du décours temporel des variations circadiennes de l'ARNm de la TPH2 et de la protéine TPH permet d'envisager le déroulement suivant dans les deux voies sérotoninergiques RD→IGL et RM→SCN (Figure 27) : les niveaux d'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM varient de façon rythmique caractérisée par un pic à ZT/CT10 permettant la mise en place de l'augmentation des concentrations de protéine TPH dont les valeurs maximales sont détectées à ZT/CT18 dans le RD-LAT et le RM. Dans les régions des terminaisons sérotoninergiques, IGL et SCN, les concentrations de protéine TPH sont maximales à ZT/CT10. Un tel décalage temporel entre la région des somas et celle des terminaisons sérotoninergiques a déjà été mis en évidence concernant l'activité enzymatique de la TPH (Kan *et al.*, 1977 ; Natali *et al.*, 1980) et correspondrait au temps nécessaire pour le transport de la protéine TPH entre ces deux régions. En effet, le transport axonal de la TPH est lent, sa vitesse est de l'ordre de 5 à 7 mm par 24 h (Meek & Neff, 1972), permettant de renforcer cette hypothèse.

La TPH présente dans les terminaisons (SCN et IGL) catalyse la synthèse de 5-HT dont la libération dans les SCN est maximale en début de nuit (Barassin *et al.*, 2002). Concernant la libération de 5-HT dans les IGL, elle n'a pas été étudiée chez le Rat vraisemblablement pour des raisons techniques. En effet, la structure anatomique des IGL qui est un feuillet transversal relativement fin dont la taille et la forme varient en fonction de l'axe rostro-caudal rend difficile une approche par microdialyse. Les sondes de microdialyse ont un diamètre qui peut être important comparativement aux structures étudiées. De plus, l'existence d'afférences sérotoninergiques dans les noyaux voisins appartenant au complexe géniculé latéral ne permettrait pas de distinguer l'origine de la 5-HT mesurée dans les dialysats. Une étude réalisée chez le Hamster syrien en photopériode longue a pourtant montré une libération nyctémérale de 5-HT dans la région des IGL (Grossman *et al.*, 2004) mais n'a pas exploré le critère circadien de cette libération. En s'appuyant sur nos résultats et étant donné le déroulement temporel des variations circadiennes de synthèse et de libération de 5-HT décrit précédemment pour la voie RM→SCN, l'existence d'une libération circadienne de 5-HT dans les IGL chez le Rat paraît toutefois vraisemblable.

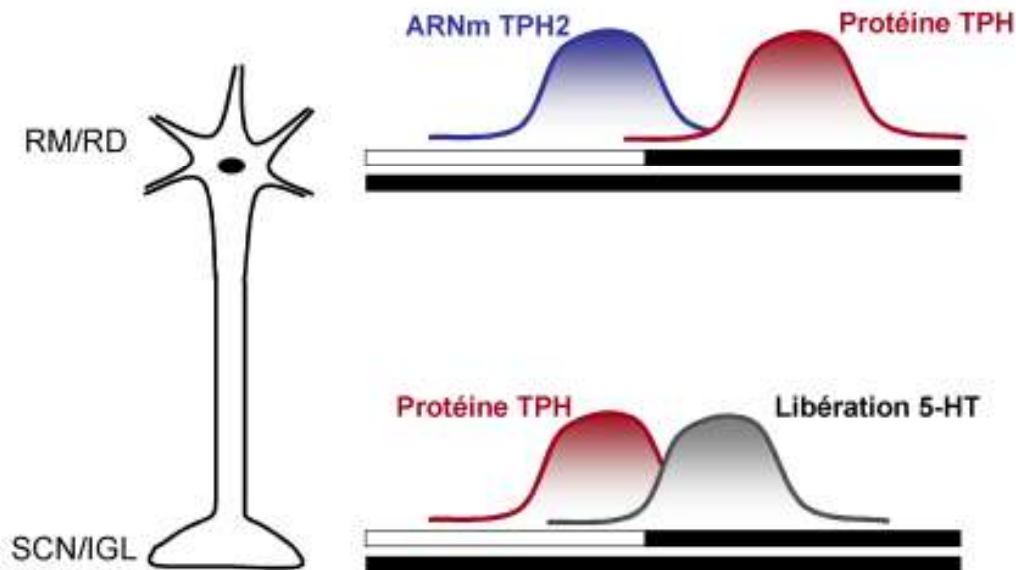


Figure 27 : Présentation schématique du déroulement temporel des variations de l'ARNm de la TPH2, de la protéine TPH et de la 5-HT dans les neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL.

L'existence d'une relation temporelle entre les variations circadiennes de l'ARNm de la TPH2 et de la protéine TPH permet d'établir une corrélation entre ces deux paramètres régulant la synthèse de 5-HT. Cependant, cette corrélation n'est pas valable pour toutes les subdivisions du RD. En effet, nous avons montré que les niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 varient dans les trois subdivisions du RD (VM, DM et LAT), alors que les concentrations de protéine TPH sont rythmiques uniquement dans les subdivisions latérales de ce noyau. L'origine d'une telle régionalisation des variations circadiennes de ces deux paramètres est inconnue. Il est important de rappeler que des études de traçage de voies avaient démontré que l'innervation sérotoninergique des IGL serait issue notamment des groupes latéraux du RD (Pasquier & Villar, 1982 ; Villar *et al.*, 1988 ; Moga & Moore, 1997). Ces résultats amènent à suggérer que la synthèse circadienne de 5-HT a lieu uniquement dans la voie RD-LAT→IGL. Dans ce cas, quelle est l'interprétation fonctionnelle des variations circadiennes de l'ARNm de la TPH2 dans le VM et le DM ?

Une régionalisation au sein du RD a été constatée concernant la durée de demi-vie de la protéine TPH (Weissmann *et al.* 1990). En effet, la demi-vie de la protéine TPH est de l'ordre de 36 heures et 48 h respectivement pour le VM, le DM, alors qu'elle est supérieure dans les LAT où elle est estimée aux alentours de 3,5 jours. Ce résultat permet de suggérer une stabilité moindre de la protéine TPH dans le VM et le DM par rapport aux LAT. Ainsi, les processus de dégradation que subit la protéine TPH seraient plus rapides dans les subdivisions VM et DM, ce qui pourrait expliquer l'absence de variations rythmiques dans ces subdivisions. Une autre explication serait l'existence de régulations en aval de la transcription du gène *tph2*, s'effectuant pendant la traduction de l'ARNm de la TPH2, qui pourraient être à l'origine de cette régionalisation des variations de la protéine TPH au sein du RD.

Sur une échelle de 24 heures, les variations de l'ARNm de la TPH2 et de la protéine TPH sont responsables de la régulation des quantités intra-neuronales de 5-HT. Les quantités extracellulaires du neurotransmetteur dépendent à la fois de la 5-HT intra-neuronale mais également des mécanismes contrôlant directement sa libération et sa dégradation. Le transporteur de la 5-HT (5-HTT) est impliqué dans la recapture de la 5-HT et l'enzyme MAO A dans sa dégradation. Par conséquent, les taux de 5-HT présents dans le milieu extracellulaire à un temps donné sont le reflet d'un équilibre entre sa synthèse, sa libération ainsi que les processus de recapture et de catabolisme que subit ce neurotransmetteur.

Le 5-HTT est exprimé à la fois dans les neurones sérotoninergiques des noyaux du Raphé (Zhou *et al.*, 1996 ; 1998) et les terminaisons contenant la 5-HT des SCN et des IGL (Amir *et al.*, 1998). Les Souris dépourvues du 5-HTT présentent une augmentation de 6 fois des concentrations de 5-HT extracellulaire (Bengel *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'inhibition de la recapture de 5-HT peut influencer la synchronisation des rythmes biologiques. En effet, la fluoxétine, un inhibiteur de recapture de 5-HT, entraîne des déphasages de type non-photique de l'activité électrique des neurones des SCN enregistrés *in vitro* (Sprouse *et al.*, 2006) et atténue l'effet synchroniseur d'un créneau lumineux sur le rythme d'activité locomotrice (Challet *et al.*, 2001). L'hypothèse de la présence de variations rythmiques du 5-HTT dans les structures du système circadien mérite d'être explorée afin de déterminer une éventuelle rythmicité dans le processus de recapture de 5-HT.

Les Souris dépourvues de la MAO A présentent, dans plusieurs régions du cerveau, une diminution des niveaux d'expression de l'ARNm du 5-HTT corrélée avec une augmentation des quantités extracellulaires de 5-HT (Evrard *et al.*, 2002). L'administration chronique de clorgyline, un inhibiteur de la MAO A, entraîne à la fois une atténuation des déphasages photiques et une altération du rythme d'activité locomotrice (Duncan *et al.*, 1988). Ce dernier effet se traduit par une diminution de la durée et de la quantité de l'activité locomotrice qui est constatée particulièrement en début de nuit, c'est à dire lorsque la libération de 5-HT dans les SCN est maximale chez des animaux contrôles.

Les études évaluant la rythmicité de l'activité enzymatique de la MAO ont révélé des résultats contradictoires. En effet, l'activité enzymatique de la MAO (A et B) a été mesurée au cours du nyctémère dans le RD et le RM et ne montre aucune variation journalière (Kan *et al.*, 1977). En revanche, une autre étude a décrit des variations nyctémérales de l'activité enzymatique des deux MAO dans le Locus Coeruleus qui sont caractérisées par un pic observé en début de nuit (Chevallard *et al.*, 1981). Dans les SCN, l'activité enzymatique de la MAO A est circadienne et semble augmenter progressivement pendant le jour subjectif (Kamase, 1980). En s'appuyant sur ce résultat, le rythme circadien de dégradation de la 5-HT anticiperait celui de la libération du neurotransmetteur au sein des SCN, contrairement à ce dont on pouvait s'attendre. La relation temporelle entre les variations circadiennes de ces deux paramètres doit être davantage étudiée.

**L'ensemble des résultats obtenus montre l'existence d'un fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL. Ce fonctionnement se manifeste par 1) une rythmicité circadienne de synthèse de 5-HT, représentée par des variations des taux d'ARNm de la TPH2 et de protéine TPH et 2) une libération circadienne de 5-HT dans les SCN, et probablement dans les IGL.**

L'existence d'une libération circadienne de 5-HT au sein de l'horloge principale pourrait constituer un paramètre clé dans le rôle de ce neurotransmetteur au sein du système circadien. En effet, le profil circadien de 5-HT est en adéquation avec l'implication de ce neurotransmetteur dans la synchronisation photique et non photique.

Les déphasages des rythmes biologiques induits par un créneau de lumière sont observés pendant la nuit subjective. Par ailleurs, le rôle modulateur de la 5-HT dans la synchronisation photique se traduit par une atténuation des déphasages induits par la lumière, observée aussi bien au début qu'à la fin de nuit subjective. Il est important de constater que l'amplitude des déphasages photiques est plus faible en début de nuit subjective, lorsque les quantités de 5-HT présentes au sein des SCN sont maximales. Au contraire, l'amplitude de ces déphasages est particulièrement importante en fin de nuit subjective, lorsque la libération de 5-HT décline.

D'autre part, les voies sérotoninergiques afférentes aux structures circadiennes interviennent dans l'intégration et la transmission des signaux non photiques. En fonction du cycle circadien, les déphasages non photiques des rythmes biologiques sont obtenus pendant une fenêtre de sensibilité restreinte et située en milieu de jour subjectif, moment pendant lequel la libération de 5-HT est minimale. À ce moment du nyctémère, les récepteurs sérotoninergiques exprimés dans les structures circadiennes ne seraient pas saturés par la 5-HT endogène permettant ainsi l'établissement des déphasages non photiques. En accord avec cette hypothèse, l'amplitude des décalages de phase induits par les stimuli non photiques en début de nuit subjective est particulièrement faible.

Dans un contexte plus large, nous pouvons envisager l'existence d'une synthèse et d'une libération circadiennes de 5-HT non seulement au sein des voies neuronales afférentes aux structures circadiennes, mais également dans l'ensemble des structures innervées par le RD et le RM. En effet, ces deux noyaux projettent vers de nombreuses régions antérieures du cerveau (pour revue voir Jacobs & Azmitia, 1992) et les quantités de 5-HT (totales ou libérées) ont été mesurées dans certaines de ces régions en fonction du cycle LD. Par

exemple, une rythmicité nycthémérale de 5-HT a été mis en évidence dans l'hippocampe (Kalén *et al.*, 1989 ; Rueter & Jacobs, 1996), le bulbe olfactif, l'hypothalamus antérieur et médiobasal (Ferraro & Steger, 1990), le striatum, l'amygdale (Rueter & Jacobs, 1996), les noyaux paraventriculaires hypothalamiques et le cortex cérébral (Poncet *et al.*, 1993). La question se pose de savoir si ces variations sont de nature circadienne, c'est dire contrôlées par l'horloge principale, ou dépendantes du cycle LD. Concernant la régulation de la synthèse de 5-HT en dehors du système circadien, elle demeure peu documentée et mérite d'être davantage explorée. Deux études ont cependant décrit des variations nycthémérales de l'activité enzymatique de la TPH dans des régions de terminaisons sérotoninergiques (Kan *et al.*, 1977 ; Poncet *et al.*, 1993). Par ailleurs, aucune étude n'a porté sur les variations circadiennes des quantités de protéine TPH dans des structures du cerveau dont l'innervation sérotoninergique est issue du RD ou du RM.

L'existence d'un signal sérotoninergique circadien au sein des régions innervées par le RD et le RM pourrait constituer un message endogène donneur du temps, modulant sur une échelle de 24 h le fonctionnement rythmique d'autres systèmes de neurotransmission. Les neurones sérotoninergiques des noyaux du Raphé seraient ainsi considérés comme un site d'intégration et de distribution du message circadien dans l'ensemble du cerveau. À titre d'exemple, l'innervation sérotoninergique des noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN) est connue pour moduler le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA, pour revue voir Chaouloff, 1993). En effet, l'action de la 5-HT se traduit par une induction de la libération du CRF au sein des PVN (Holmes *et al.*, 1982 ; Calogero *et al.*, 1989). La présence d'une libération circadienne de 5-HT au sein des PVN pourrait représenter un paramètre intervenant dans la régulation du fonctionnement rythmique de l'axe HPA.

## **B. Régulation de l'expression rythmique du gène *tph2***

L'existence d'une synthèse et d'une libération circadiennes de 5-HT dans les structures du système circadien soulève la question de l'origine de cette rythmicité. Ce fonctionnement circadien serait-il endogène aux noyaux du Raphé ? ou bien dépendant de l'horloge principale ?

### **I. Rythmicité endogène ?**

L'existence d'un oscillateur dans les neurones sérotoninergiques des noyaux du Raphé pourrait être à l'origine de la rythmicité circadienne de synthèse et de libération de 5-HT. L'expression des gènes de l'horloge a été explorée dans les noyaux du Raphé par hybridation *in situ* radioactive. Les gènes *Per1*, *Per2* et *Clock* sont très faiblement exprimés dans le RD chez des Rat sacrifiés en milieu de jour (ZT4-ZT6, Shieh, 2003). Il en est de même concernant l'expression du gène *Per1* à ZT4 chez le Hamster, qui est pratiquement indétectable dans le RD (Yamamoto *et al.*, 2001). Ces résultats permettent d'exclure l'existence d'un oscillateur ubiquitaire et robuste au sein des noyaux du Raphé. Toutefois, un niveau d'expression faible et confiné à quelques neurones sérotoninergiques pourrait être présent et générer des oscillations endogènes. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant des techniques permettant de détecter à l'échelle cellulaire l'expression de ces gènes dans le Raphé, telles que l'hybridation *in situ* non-radioactive ou radioactive suivie d'une émulsion photographique.

### **II. Rythmicité contrôlée par les SCN ?**

Le fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques pourrait par ailleurs être dépendant de l'horloge des SCN *via* des effecteurs nerveux, endocrines ou encore comportementaux.

#### **1. Effecteurs nerveux**

Les noyaux du Raphé ne sont pas directement innervés par les SCN, mais l'existence d'une connexion multisynaptique entre ces deux structures est envisageable. Des relais



hypothalamiques pourraient être impliqués dans une telle voie (Deurveilher & Semba, 2005). L'aire préoptique médiane (MPOA), par exemple, est directement innervée par les SCN (Watts & Swanson, 1987) et envoie des projections sur le RD (Aghajanian & Wang, 1977). Il reste cependant à déterminer si les neurones de la MPOA innervés par les SCN sont ceux impliqués dans la voie qui projette sur les noyaux du Raphé. Une autre région hypothalamique pourrait être impliquée dans une telle voie : il s'agit de l'hypothalamus latéral (LH), qui reçoit une innervation en provenance des SCN *via* la zone subparaventriculaire et l'hypothalamus dorsomédian. Le LH contient des neurones à orexine qui jouent un rôle dans la régulation du cycle veille/sommeil (pour revue voir Saper *et al.*, 2005b). Il existe une voie de projection directe entre le LH et le RD (Aghajanian & Wang, 1977) et des fibres contenant l'orexine ont été mises en évidence dans ce dernier noyau (Peyron *et al.*, 1998).

L'implication de structures situées à l'extérieur de l'hypothalamus dans une connexion SCN → Raphé est également envisageable. En effet, le Locus Coeruleus, région des corps cellulaires noradrénergiques, reçoit une innervation provenant des SCN *via* plusieurs relais hypothalamiques (Aston-Jones *et al.*, 2001). Par ailleurs, les neurones noradrénergiques projettent directement sur le RD (Baraban & Aghajanian, 1981 ; Peyron *et al.*, 1996).

Des expériences de traçage trans-synaptique entre les SCN et les noyaux du Raphé permettront de confirmer ou d'infirmer la présence de voies de connexion indirectes.

## 2. Effecteurs endocrines

Parmi les sorties endocrines de l'horloge, nous avons étudié l'implication de la sécrétion rythmique de corticostérone dans la genèse de la rythmicité de l'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM. Nous avons démontré que la rythmicité de l'ARNm de la TPH2 dans le RM et le RD est dépendante des variations journalières de la sécrétion de corticostérone. En effet, l'ablation des glandes surrénales entraîne une suppression totale de la rythmicité de l'ARNm de la TPH2. De plus, la restauration artificielle du pic nocturne de corticostérone chez des Rats surrénalectomisés induit une variation rythmique de l'ARNm de la TPH2 dont le profil dépend de l'augmentation nocturne de cette hormone, permettant d'établir une relation temporelle entre ces deux paramètres. Cette relation temporelle pourrait être restreinte à la nuit, reflétant ainsi l'existence d'une fenêtre temporelle de sensibilité concernant l'action de cette hormone sur les neurones sérotoninergiques. Afin d'étudier cette éventualité, nous pouvons envisager de restaurer, pendant le jour, la rythmicité de la corticostérone chez des

animaux surrénalectomisés et de suivre le profil journalier de l'expression de l'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM.

Nos résultats confirment l'implication directe de la sécrétion rythmique de corticostérone, sortie endocrine des SCN, dans la rythmicité de l'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM (Figure 28). Ces données amènent à la question suivante : quelle interprétation fonctionnelle peut-on donner à ces variations rythmiques contrôlées par la corticostérone ? L'action de cette sortie endocrine sur les neurones sérotoninergiques pourrait influencer la rythmicité de la protéine TPH dans les deux voies RD→IGL et RM→SCN. De plus, la libération rythmique de 5-HT dans les SCN pourrait être également dépendante de la sécrétion journalière de corticostérone, permettant ainsi à cette hormone de rétroagir, *via* les neurones sérotoninergiques, sur l'horloge principale. Chez des animaux dont les glandes surrénales sont intactes, nous avons mis en évidence une corrélation entre les variations circadiennes de synthèse et de libération de 5-HT au sein des voies neuronales afférentes aux structures circadiennes. Ainsi, la possibilité d'une régulation de la libération rythmique de 5-HT par la corticostérone paraît envisageable. Cette hypothèse doit néanmoins être confirmée en mesurant la libération de 5-HT dans les SCN après surrénalectomie et restauration artificielle du pic nocturne de corticostérone.

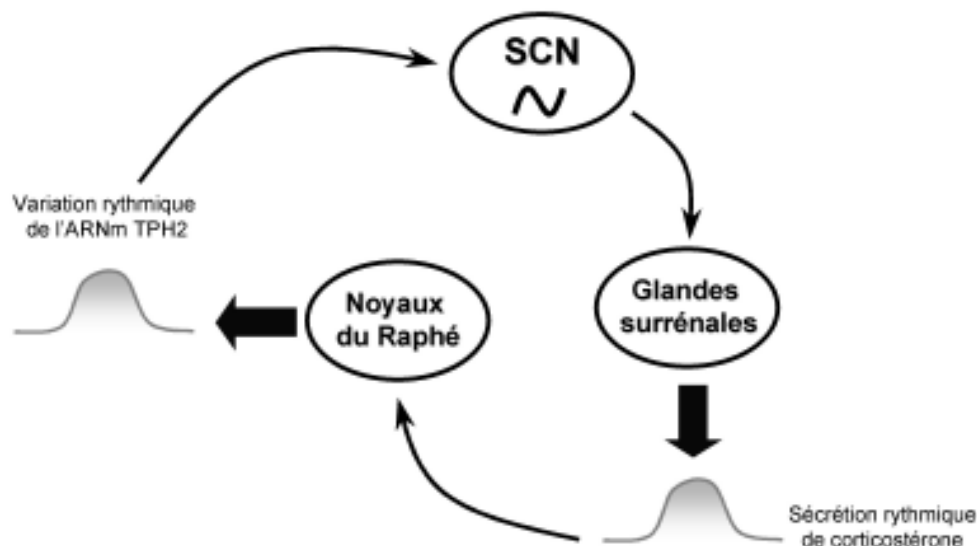


Figure 28 : Les variations rythmiques de l'ARNm de la TPH2 dans les neurones sérotoninergiques sont contrôlées par l'horloge principale via la sécrétion rythmique de corticostérone.

L'action des glucocorticoïdes sur l'expression rythmique du gène *tph2* pourrait s'effectuer directement au niveau des neurones sérotoninergiques qui possèdent les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR, Härfstrand *et al.*, 1986 ; Malek *et al.*, 2006). Les GR sont des récepteurs nucléaires connus pour moduler l'expression génique par l'intermédiaire des séquences GRE (*Glucocorticoids Response Element*). Des séquences GRE ont été localisées dans les promoteurs de gènes dont l'expression est régulée par les glucocorticoïdes tels que le gène codant le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (Ou *et al.*, 2001) ou encore le gène codant la tyrosine hydroxylase (Hagerty *et al.*, 2001). Cependant, aucune étude n'a décrit la présence d'une séquence GRE au sein du promoteur du gène *tph2*, ce qui amène à s'interroger sur le mécanisme d'action des glucocorticoïdes sur l'expression de ce gène. Une autre façon de vérifier la réalité d'une action directe des glucocorticoïdes sur les neurones sérotoninergiques serait l'utilisation d'antagonistes GR, tels que le RU 38486. Leur administration dans la région du Raphé, si elle conduisait à la suppression du rythme de l'ARNm de la TPH2, permettrait cette démonstration.

Nous ne pouvons pas exclure toutefois que l'effet synchroniseur des glucocorticoïdes sur les neurones sérotoninergiques soit indirecte par une action sur une structure relais. Il est connu par exemple que dans l'amygdale centrale, les variations rythmiques de la protéine PER2 sont induites par le rythme journalier de corticostérone (Segall *et al.*, 2006). Il est aussi connu que l'amygdale projette sur le RD (Russchen, 1982) et est impliquée dans la modulation de la synthèse de 5-HT dans ce noyau du Raphé (Singh *et al.*, 1992a et b ; Boadle-Biber *et al.*, 1993). L'amygdale centrale pourrait donc être une structure relais mise en jeu dans l'effet des glucocorticoïdes sur l'expression rythmique de l'ARNm de la TPH2. Une analyse de cette expression rythmique après lésion de l'amygdale centrale permettrait de vérifier ce point.

La capacité des glucocorticoïdes à générer le fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques afférents au système circadien pourrait constituer une étape clé dans l'action de ces hormones sur les SCN. Les glucocorticoïdes pourraient être considérés comme un zeitgeber pour l'horloge, en effet, une étude a montré que des injections de dexaméthasone peuvent synchroniser le rythme de température corporelle chez le Rat maintenu en obscurité constante (Horseman & Ehret, 1982). Pourtant, les SCN ne présentent que peu, voire pas de récepteurs GR (Fuxe *et al.*, 1985 ; Ahima & Harlan, 1990 ; Cintra *et al.*, 1994 ; Morimoto *et al.*, 1996). Ce qui suppose l'existence d'une structure relais sensible aux glucocorticoïdes et

pouvant interagir avec les SCN. Nos résultats permettent de suggérer que les neurones sérotoninergiques des noyaux du Raphé pourraient être ce relais. Ainsi, la rétroaction des glucocorticoïdes sur l'horloge pourrait s'effectuer *via* les afférences sérotoninergiques (Figure 28). En accord avec cette hypothèse, Sage et collaborateurs (2004) ont démontré que la lésion des afférences sérotoninergiques des SCN atténue l'effet synchroniseur de la corticostérone sur le rythme d'activité locomotrice suite à un décalage du cycle LD. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet synchroniseur des injections de dexaméthasone à la suite d'une lésion neurochimique des fibres sérotoninergiques au sein des SCN.

Des interactions entre les glucocorticoïdes et le système sérotoninergique ont été documentées dans le cadre des troubles psychiatriques telles que la dépression. En effet, un dysfonctionnement du système sérotoninergique est constaté chez les patients dépressifs et ceci se manifeste notamment par une diminution des quantités de 5-HT dans l'espace synaptique (Asberg & Traskman, 1981). De ce fait, des inhibiteurs de recapture de la 5-HT tels que la fluoxétine, ont été utilisés comme antidépresseurs. Des perturbations des rythmes biologiques peuvent être également associées aux symptômes de la dépression. Des avances de phase des rythmes biologiques, tels que le cycle veille/sommeil ou encore le rythme de température corporelle ont été constatées. De plus, chez certains patients dépressifs, des altérations du fonctionnement de l'axe HPA, et plus particulièrement du rythme de sécrétion des glucocorticoïdes ont été rapportées (Deuschle *et al.*, 1997). En effet, une augmentation des taux de glucocorticoïdes est constatée pendant la phase du repos chez ces patients, induisant ainsi une diminution de l'amplitude de la variation journalière de la sécrétion de ces hormones.

De telles perturbations du rythme de sécrétion des glucocorticoïdes peuvent être reproduites chez l'animal en utilisant des implants sous-cutanés délivrant des niveaux constants, plus élevés que les taux diurnes, de cette hormone. Ainsi, il a été démontré que des niveaux constants et élevés de corticostérone au cours du nyctémère peuvent entraîner une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, qui se traduit par une augmentation de la libération de 5-HT dans l'hippocampe (Leitch *et al.*, 2003). De plus, Gastride et collaborateurs (2003) ont montré que l'action de la fluoxétine est atténuée lorsque le rythme de corticostérone est aboli. Ainsi, l'altération de la sécrétion rythmique des glucocorticoïdes dans le cadre de la dépression semble participer aux dysfonctionnements du système sérotoninergique. En accord avec ces résultats, nous avons montré que des niveaux diurnes et

constants de corticostérone au cours du nyctémère peuvent induire une suppression du rythme d'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM. Pour explorer plus en avant l'interaction fonctionnelle entre les deux paramètres dans le cadre de la pathologie de dépression, l'étude du fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques dans un modèle animal de dépression pourrait être envisagée.

Nous avons étudié l'effet des variations photopériodiques sur l'expression journalière du gène *tph2* dans les deux noyaux du Raphé et avons montré que le profil des variations nyctémérales de l'ARNm de la TPH2 est différent en fonction de la durée de la photopériode. Ce résultat amène à s'interroger sur le retentissement des variations de la photopériode sur les quantités de protéine TPH ou encore sur la libération de 5-HT dans les voies RM→SCN et RD→IGL. En s'appuyant sur nos résultats obtenus sur une échelle circadienne, nous pouvons émettre l'hypothèse que la libération de 5-HT au sein des SCN pourrait également varier en fonction de la photopériode. Des changements photopériodiques des quantités de 5-HT libérée dans les SCN (et également dans les IGL) pourraient alors moduler le fonctionnement de l'horloge à l'échelle saisonnière.

En cycle LD, les variations rythmiques de l'ARNm de la TPH2 sont dépendantes du rythme journalier de corticostérone. Par ailleurs, la sécrétion de corticostérone chez le Rat varie en fonction des conditions photopériodiques (Ahlersova *et al.*, 1992 ; Tritschler *et al.*, travaux non publiés) et pourrait être considérée comme une sortie saisonnière de l'horloge. Nous pouvons ainsi envisager que cette sortie endocrine de l'horloge principale soit responsable des variations photopériodiques de l'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM. Afin de confirmer l'implication directe de la corticostérone en tant que messager saisonnier dans ces variations, il faudrait étudier l'effet de la surrénalectomie et de la restauration artificielle des variations photopériodiques de corticostérone sur les profils d'expression de l'ARNm de la TPH2. D'autre part, le décodage de l'information photopériodique pourrait s'effectuer *via* des modifications de l'expression des récepteurs GR au sein du Raphé en fonction de la photopériode. De telles modifications ont été constatées concernant les récepteurs GR dans l'hippocampe et l'hypothalamus (Pyter *et al.*, 2007). L'étude de l'expression de ces récepteurs dans les neurones sérotoninergiques chez des Rats maintenues en LP et en SP permettrait d'élucider cette éventualité.

La sécrétion nocturne de mélatonine par la glande pinéale est directement contrôlée par les SCN et cette sortie endocrine pourrait également influencer le fonctionnement rythmique des neurones sérotoninergiques. En effet, des interactions entre la mélatonine et la 5-HT au sein du système circadien ont été décrites dans la littérature. La mélatonine bloque les déphasages induits par la 8-OH-DPAT *in vitro* (activité électrique des neurones des SCN, Prosser, 1999) et *in vivo* (activité locomotrice, Caldelas *et al.*, 2005). Cette hormone serait également impliquée dans la régulation du métabolisme de la 5-HT dans les SCN (Miguez *et al.*, 1996). Cependant, l'effet de la mélatonine sur la synthèse circadienne de 5-HT n'a pas été exploré, et pourrait être mis en évidence suite à une pinéalectomie ou encore en condition de lumière continue (LL), connues pour inhiber la sécrétion nocturne de mélatonine. De plus, la mélatonine, dont la durée de sécrétion est proportionnelle à la longueur de la nuit, constitue un signal endocrine saisonnier et pourrait également être impliquée dans l'effet constaté de la photopériode sur les profils journaliers de l'ARNm de la TPH2. Les récepteurs de la mélatonine ne sont pas exprimés au sein des noyaux du Raphé chez le Rat (Masson-Pévet *et al.*, 1994). Ainsi, l'action éventuelle de cette hormone sur les neurones sérotoninergiques s'effectuerait indirectement *via* un ou plusieurs relais sensibles à la mélatonine et capables de moduler le fonctionnement des neurones sérotoninergiques.

Les stéroïdes sexuels sont par ailleurs connus pour interagir avec le système sérotoninergique pour moduler son fonctionnement. En effet, l'injection intracérébroventriculaire de stéroïdes sexuels (testostérone et œstradiol) entraîne une augmentation de la fréquence de décharge des neurones sérotoninergiques du RD chez le Rat (Robichaud & Debonnel, 2005). De plus, l'administration chronique d'œstradiol chez la Ratte induit une augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM (Hiroi *et al.*, 2006). Cependant, un tel effet n'a pas été retrouvé chez la Souris (Clark *et al.*, 2005). L'action de ces hormones sur les neurones sérotoninergiques s'effectuerait *via* leurs récepteurs exprimés au sein du RD : les récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone (Alves *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 2001a) et aux androgènes (Sheng *et al.*, 2004).

Sur une échelle circadienne, l'implication de ces hormones dans l'expression rythmique de l'ARNm de la TPH2 pourrait être évaluée chez des animaux castrés et ayant subi un traitement hormonal en utilisant des implants sous-cutanés. En revanche, un rôle joué par ces hormones dans les variations photopériodiques de l'expression journalière de l'ARNm de la TPH2 paraît peu probable chez le Rat. En effet, les taux d'hormones sexuelles sont

indépendants de la photopériode chez cette espèce dont la fonction de reproduction n'est pas saisonnière.

### 3. Effecteur comportemental

Nous avons analysé l'effet de l'induction de l'activité locomotrice sur l'expression du gène *tph2* dans le RD et le RM et avons montré que l'accès à une roue pendant six semaines entraîne une augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 à ZT10 mais pas à ZT2, ce qui est en accord avec des résultats obtenus par Foley et collaborateurs (2006). Il est étonnant de constater que l'induction de l'activité locomotrice chez des Rats surrénalectomisés est capable de générer une variation significative de l'ARNm de la TPH2 entre ZT2 et ZT10. De plus, cet effet de l'activité locomotrice se manifeste par une diminution des niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2 à ZT2, alors qu'aucun effet n'est constaté à ZT10. L'ensemble de ces résultats démontre que l'activité locomotrice induite 1) entraîne une augmentation de l'amplitude de la variation ZT2/ZT10 de l'ARNm de la TPH2 ; 2) est capable de générer une rythmicité de l'ARNm de la TPH2 même en absence d'une sécrétion rythmique de corticostérone. Ainsi, l'effet de l'activité locomotrice sur l'expression de l'ARNm de la TPH2 semble être indépendant des glucocorticoïdes. Cependant, la modalité de l'action de l'activité locomotrice est différente selon la présence ou non d'une sécrétion rythmique de corticostérone.

Nous avons étudié l'effet de l'activité locomotrice induite sur l'expression de l'ARNm de la TPH2 à deux points horaire (ZT2 et ZT10) qui correspondent respectivement au nadir et au pic de la variation journalière de cet ARNm. Un effet de ce comportement à d'autres moments du nyctémère pourrait être également envisageable. Pour mettre évidence une telle action, il faudrait analyser l'effet de l'induction de l'activité locomotrice sur l'expression de l'ARNm de la TPH2 pendant un cycle de 24 h chez des animaux contrôles mais aussi surrénalectomisés.

L'induction de l'activité locomotrice par un accès prolongé à une roue est associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone (Fediuc *et al.*, 2006). Au bout de 4 semaines, une adaptation du fonctionnement de l'axe HPA semble se reproduire puisque les concentrations plasmatiques de corticostérone mesurées alors sont similaires entre les Rats ayant ou non accès à la roue. Nous avons évalué l'effet de l'activité locomotrice

induite sur l'expression de l'ARNm de la TPH2 après 6 semaines d'accès à une roue. À la fin de ces 6 semaines, nous n'avons pas observé de modifications des concentrations de corticostérone chez les Rats ayant eu accès à la roue, ce qui est en accord avec l'étude de Fediuc et collaborateurs (2006). Néanmoins, notre protocole expérimental ne nous a pas permis de savoir si la modulation de l'expression de l'ARNm de la TPH2 par l'activité locomotrice pourrait s'effectuer pendant la période où le fonctionnement de l'axe HPA est modifié par ce comportement. Pour vérifier cette éventualité, une étude du décours temporel de l'effet de l'activité locomotrice induite sur l'expression du gène *tph2* et les concentrations plasmatiques de corticostérone paraît nécessaire.

Nous avons montré que l'induction prolongée de l'activité locomotrice, module l'expression de l'ARNm de la TPH2, un paramètre intervenant dans la régulation de la synthèse de 5-HT. Cet effet est observé dans les deux noyaux du Raphé impliqués dans l'innervation sérotoninergique du système circadien. Par ailleurs, des études ont montré que l'induction, à court terme, de l'activité locomotrice augmente la libération de 5-HT dans les SCN (Dudley *et al.*, 1998), les IGL (Grossman *et al.*, 2004). Cependant, l'effet de l'activité locomotrice induite à long terme sur la libération de 5-HT dans les structures circadiennes n'a pas été décrit, et pourrait être évalué par une approche *in vivo* utilisant la microdialyse intracérébrale chez des Rats contrôles et surrénalectomisés.

Nos résultats permettent de suggérer que l'effet de l'activité locomotrice sur le fonctionnement de l'horloge principale pourrait s'effectuer *via* les neurones sérotoninergiques des noyaux du Raphé. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'activité locomotrice induite par la nouveauté d'une roue peut entraîner des modifications dans l'expression des gènes *per* dans les SCN (Maywood *et al.*, 1999), qui sont similaires à celles obtenues après une stimulation sérotoninergique (Caldelas *et al.*, 2005). La même activation comportementale induit, rappelons-le, une augmentation de la libération de 5-HT dans les SCN (Dudley *et al.*, 1998).

Nous avons mis en évidence un effet de l'activité locomotrice induite par la roue sur l'expression de l'ARNm de la TPH2 dans le RD et le RM. Nos résultats amènent à s'interroger sur le mécanisme mis en jeu dans l'effet de ce comportement sur les neurones sérotoninergiques.

Des études ont montré que l'activité locomotrice induite entraîne une augmentation de l'expression du BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), dans plusieurs régions



cérébrales telles que l'hippocampe, le cortex cérébral, le cervelet (Neeper *et al.*, 1996 ; Vaynman *et al.*, 2004) et la substance noire (Van Hoomissen *et al.*, 2003). Le BDNF appartient à la famille des neurotrophines, dont la synthèse et la libération sont sous le contrôle de l'activité neuronale. Les neurones sérotoninergiques du RD expriment le récepteur au BDNF, la tyrosine kinase B (trkB, Madhav *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que le BDNF module plusieurs paramètres spécifiques des neurones sérotoninergiques tels que l'activité électrique (Celada *et al.*, 1996) et le métabolisme de la 5-HT (Siuciak *et al.*, 1996 ; 1998). En effet, l'application locale de BDNF dans le RD entraîne une augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH (Siuciak *et al.*, 1998). Nous pouvons émettre l'hypothèse de l'implication du BDNF dans l'effet de l'induction de l'activité locomotrice sur l'expression du gène *tph2* dans les RD. Cet effet pourrait s'effectuer *via* une voie neuronale issue d'une des structures exprimant ce facteur. À titre d'exemple, la substance noire, qui projette sur le RD (Kalen *et al.*, 1985), pourrait être impliquée dans cette voie. D'autre part, l'implication de la MPOA qui contient une densité importante d'ARNm du BDNF (Hofer *et al.*, 1990) et envoie des projections sur le RD (Aghajanian & Wang, 1977) serait également envisageable. Cependant, aucune étude n'a évalué l'effet de l'activité locomotrice induite sur les niveaux d'expression du BDNF dans la MPOA. L'implication de cette neurotrophine dans l'effet de l'activité locomotrice sur l'expression du gène *tph2* pourrait être analysée en bloquant les récepteurs trkB des noyaux du Raphé chez des Rats ayant accès, à long terme, à une roue.

D'autre part, il a été démontré que le CRF (*Corticotropin Releasing Factor*) peut influencer le comportement locomoteur, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité locomotrice suite à l'application de ce facteur dans le cerveau (Eaves *et al.*, 1985 ; Tazi *et al.*, 1987 ; Krahn *et al.*, 1988). De plus, l'induction de l'activité locomotrice par une roue augmente les niveaux d'expression de l'ARNm du CRF dans le noyau dorsomédian hypothalamique (Bi *et al.*, 2005 ; Kawaguchi *et al.*, 2005). Ce noyau hypothalamique envoie des projections sur le RD et le RM comme ont pu le montrer des études de traçage de voies rétrograde (Kalen *et al.*, 1985 ; Behzadi *et al.*, 1990). Les récepteurs au CRF sont exprimés dans les neurones du RD (Van Pett *et al.*, 2000 ; Day *et al.*, 2004) et des terminaisons synaptiques contenant le CRF ont été identifiés au contact des neurones sérotoninergiques et GABAergiques du même noyau (Waselus *et al.*, 2005). De plus, des interactions entre le CRF et le système sérotoninergique ont été documenté. En effet, le CRF module l'activité

électrique des neurones sérotoninergiques (Kirby *et al.*, 2000), l'activité enzymatique de la TPH (Boadle-Biber *et al.*, 1993) et la libération de 5-HT (Price & Lucki, 2001). L'effet de l'activité locomotrice sur les neurones sérotoninergiques pourrait ainsi s'effectuer *via* une activation du noyau dorsomédian hypothalamique corrélée avec une induction de l'expression du CRF. Pour évaluer l'implication d'un mécanisme CRF-dépendant dans l'effet de l'activité locomotrice sur l'expression du gène *tph2*, nous pouvons envisager de 1) quantifier le CRF dans les noyaux du Raphé en relation avec l'activité locomotrice induite ; 2) analyser l'effet des injections du CRF sur les niveaux d'expression de l'ARNm de la TPH2.

**Nous avons démontré que l'expression rythmique de l'ARNm de la TPH2 est contrôlée au moins par deux des sorties de l'horloge principale. La sécrétion rythmique de corticostérone contrôle directement la rythmicité de l'ARNm de la TPH2 et l'induction de l'activité locomotrice module les niveaux d'expression de cet ARNm aussi bien chez des animaux contrôles que surrénalectomisés.**

**En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus à l'issue de ce travail de thèse permet de mettre en évidence un fonctionnement circadien des neurones sérotoninergiques du RD et du RM. Ce fonctionnement se manifeste par des variations circadiennes de l'ARNm de la TPH2 et la protéine TPH, deux paramètres contrôlant la synthèse de 5-HT, dans les voies neuronales RD→IGL et RM→SCN. De plus, nous avons montré une régulation photopériodique des profils journaliers de l'ARNm de la TPH2 dans les deux noyaux du Raphé, permettant de suggérer une modulation de la synthèse de 5-HT en fonction de la photopériode. L'existence d'un fonctionnement circadien et photopériodique des neurones sérotoninergiques pourrait constituer un signal temporel, journalier et saisonnier, distribué dans l'ensemble des régions cérébrales recevant une innervation sérotoninergique de ces deux noyaux du Raphé.**

**Sur une échelle de temps circadien, deux sorties rythmiques de l'horloge principale influencent le fonctionnement de ces neurones en modulant l'expression du gène *tph2*. L'action de ces signaux sur l'horloge principale des SCN pourrait ainsi s'effectuer *via* les neurones sérotoninergiques du RD et du RM, considérés alors comme un relais capable d'intégrer à la fois des messages endocrines et comportementaux.**



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## A

- 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.
- Abrahamson E. E. and Moore R. Y. (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* **916**, 172-191.
- Abumaria N., Rygula R., Havemann-Reinecke U., Ruther E., Bodemer W., Roos C. and Flugge G. (2006a) Identification of genes regulated by chronic social stress in the rat dorsal raphe nucleus. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 145-162.
- Abumaria N., Rygula R., Hiemke C., Fuchs E., Havemann-Reinecke U., Ruther E. and Flugge G. (2006b) Effect of chronic citalopram on serotonin-related and stress-regulated genes in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. Article in Press.
- Adell A., Casanovas J. M. and Artigas F. (1997) Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology* **36**, 735-741.
- Aghajanian G. K. (1982) Regulation of serotonergic neuronal activity: autoreceptors and pacemaker potentials. *Adv Biochem Psychopharmacol* **34**, 173-181.
- Aghajanian G. K. and Vandermaelen C. P. (1982) Intracellular recording in vivo from serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: methodological considerations. *J Histochem Cytochem* **30**, 813-814.
- Aghajanian G. K. and Wang R. Y. (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* **122**, 229-242.
- Ahima R. S. and Harlan R. E. (1990) Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* **39**, 579-604.
- Ahima R., Krozowski Z. and Harlan R. (1991) Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol* **313**, 522-538.
- Ahlersova E., Ahlers I., Smajda B. and Kassayova M. (1992) The effect of various photoperiods on daily oscillations of serum corticosterone and insulin in rats. *Physiol Res* **41**, 315-321.
- Aida R., Moriya T., Araki M., Akiyama M., Wada K., Wada E. and Shibata S. (2002) Gastrin-releasing peptide mediates photic entrainable signals to dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of Period gene in mice. *Mol Pharmacol* **61**, 26-34.
- Akhtar R. A., Reddy A. B., Maywood E. S., Clayton J. D., King V. M., Smith A. G., Gant T. W., Hastings M. H. and Kyriacou C. P. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* **12**, 540-550.
- Albrecht U., Sun Z. S., Eichele G. and Lee C. C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* **91**, 1055-1064.
- Albrecht U., Zheng B., Larkin D., Sun Z. S. and Lee C. C. (2001) MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* **16**, 100-104.
- Albus H., Vansteensel M. J., Michel S., Block G. D. and Meijer J. H. (2005) A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol* **15**, 886-893.
- Allers K. A. and Sharp T. (2003) Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience* **122**, 193-204.
- Alves S. E., Weiland N. G., Hayashi S. and McEwen B. S. (1998) Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progesterin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* **391**, 322-334.
- 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.
- Amir S., Robinson B., Ratovitski T., Rea M. A., Stewart J. and Simantov R. (1998) A role for serotonin in the circadian system revealed by the distribution of serotonin transporter and light-induced Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet. *Neuroscience* **84**, 1059-1073.

Antle M. C. and Mistlberger R. E. (2000) Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster. *J Neurosci* **20**, 9326-9332.

Arendt J. (1998) Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* **3**, 13-22.

Aronsson M., Fuxe K., Dong Y., Agnati L. F., Okret S. and Gustafsson J. A. (1988) Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9331-9335.

Asberg M. and Traskman L. (1981) Studies of CSF 5-HIAA in depression and suicidal behaviour. *Adv Exp Med Biol* **133**, 739-752.

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.

Aton S. J., Colwell C. S., Harmar A. J., Waschek J. and Herzog E. D. (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* **8**, 476-483.

Azmitia E. C., Liao B. and Chen Y. S. (1993) Increase of tryptophan hydroxylase enzyme protein by dexamethasone in adrenalectomized rat midbrain. *J Neurosci* **13**, 5041-5055.

Azmitia E. C. and Segal M. (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* **179**, 641-667.

## B

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 signalling. *Science* **289**, 2344-2347.

Baraban J. M. and Aghajanian G. K. (1981) Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res* **204**, 1-11.

Baraban J. M. and Aghajanian G. K. (1980) Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* **19**, 355-363.

Barassin S., Raison S., Saboureau M., Bienvenu C., Maitre M., Malan A. and Pevet P. (2002) Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* **15**, 833-840.

Behzadi G., Kalen P., Parvopassu F. and Wiklund L. (1990) Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs. *Neuroscience* **37**, 77-100.

Bequet F., Gomez-Merino D., Berthelot M. and Guezenec C. Y. (2001) Exercise-induced changes in brain glucose and serotonin revealed by microdialysis in rat hippocampus: effect of glucose supplementation. *Acta Physiol Scand* **173**, 223-230.

Bengel D., Murphy D. L., Andrews A. M., Wichems C. H., Feltner D., Heils A., Mossner R., Westphal H. and Lesch K. P. (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* **53**, 649-655.

Bernard M., Guerlotte J., Greve P., Grechez-Cassiau A., Iuvone M. P., Zatz M., Chong N. W., Klein D. C. and Voisin P. (1999) Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reprod Nutr Dev* **39**, 325-334.

Berson D. M., Dunn F. A. and Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**, 1070-1073.

Besancon R., Simonneaux V., Jouveta A., Belin M. F. and Fevre-Montange M. (1996) Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* **40**, 136-138.

Bi S., Scott K. A., Hyun J., Ladenheim E. E. and Moran T. H. (2005) Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. *Endocrinology* **146**, 1676-1685.

Biello S. M. (1995) Enhanced photic phase shifting after treatment with antiserum to neuropeptide Y. *Brain Res* **673**, 25-29.

Biello S. M., Golombek D. A. and Harrington M. E. (1997) Neuropeptide Y and glutamate block each other's phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience* **77**, 1049-1057.

Biello S. M., Harrington M. E. and Mason R. (1991) Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res* **552**, 47-52.

Biello S. M., Janik D. and Mrosovsky N. (1994) Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience* **62**, 273-279.

Boadle-Biber M. C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* **60**, 1-15.

Boadle-Biber M. C., Singh V. B., Corley K. C., Phan T. H. and Dilts R. P. (1993) Evidence that corticotropin-releasing factor within the extended amygdala mediates the activation of tryptophan hydroxylase produced by sound stress in the rat. *Brain Res* **628**, 105-114.

Boado R. J., Li J. Y., Nagaya M., Zhang C. and Pardridge W. M. (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12079-12084.

Bosler O. (1989) Ultrastructural relationships of serotonin and GABA terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. Evidence for a close interconnection between the two afferent systems. *J Neurocytol* **18**, 105-113.

Bosler O. and Beaudet A. (1985) VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol* **14**, 749-763.

Bramley J. R., Sollars P. J., Pickard G. E. and Dudek F. E. (2005) 5-HT<sub>1B</sub> receptor-mediated presynaptic inhibition of GABA release in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* **93**, 3157-3164.

Brewer J. M., Yannielli P. C. and Harrington M. E. (2002) Neuropeptide Y differentially suppresses *per1* and *per2* mRNA induced by light in the suprachiasmatic nuclei of the golden hamster. *J Biol Rhythms* **17**, 28-39.

Brown F., Nicholass J. and Redfern P. H. (1982) Synaptosomal tryptophan-hydroxylase activity in rat brain measured over 24-hours. *Neurochem Int* **4**, 181-183.

Buijs R. M., Hou Y. X., Shinn S. and Renaud L. P. (1994) Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* **340**, 381-391.

Buijs R. M., Pool C. W., van Heerikhuize J. J., Sluiter A. A., Van der Sluis P. J., Ramkema M., van der Woude T. P. and Van Der Beek E. (1989) Antibodies to small transmitter molecules and peptides: production and application of antibodies to dopamine, serotonin, GABA, vasopressin, vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y, somatostatin and substance P. *Biomed. Res.* **10**, 213-221.

Buijs R. M., Wortel J., JJ V. H., Feenstra M. G., GJ T. H., Romijn H. J. and Kalsbeek A. (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* **11**, 1535-1544.

Bunger M. K., Wilsbacher L. D., Moran S. M., Clendenen 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.

Byku M. and Gannon R. L. (2000) Opioid induced non-photic phase shifts of hamster circadian activity rhythms. *Brain Res* **873**, 189-196.

## C

Caldelas I., Challet E., Saboureau M. and Pevet P. (2005) Light and melatonin inhibit in vivo serotonergic phase advances without altering serotonergic-induced decrease of *per* expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Mol Neurosci* **25**, 53-63.

Calogero A. E., Bernardini R., Margioris A. N., Bagdy G., Gallucci W. T., Munson P. J., Tamarkin L., Tomai T. P., Brady L., Gold P. W. and et al. (1989) Effects of serotonergic agonists and antagonists on corticotropin-releasing hormone secretion by explanted rat hypothalami. *Peptides* **10**, 189-200.

Card J. P., Brecha N., Karten H. J. and Moore R. Y. (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* **1**, 1289-1303.

Card J. P., Fitzpatrick-McElligott S., Gozes I. and Jr B. F. (1988) Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res* **252**, 307-315.



- Card J. P. and Moore R. Y. (1989) Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol* **284**, 135-147.
- Cash C. D., Vayer P., Mandel P. and Maitre M. (1985) Tryptophan 5-hydroxylase. Rapid purification from whole rat brain and production of a specific antiserum. *Eur J Biochem* **149**, 239-245.
- Celada P., Siuciak J. A., Tran T. M., Altar C. A. and Tepper J. M. (1996) Local infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies the firing pattern of dorsal raphe serotonergic neurons. *Brain Res* **712**, 293-298.
- Cespuglio R., Faradji H., Gomez M. E. and Jouvet M. (1981) Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats. *Neurosci Lett* **24**, 133-138.
- Challet E. and Pevet P. (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci* **8**, s246-57.
- Challet E., Pevet P. and Malan A. (1996) Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci Lett* **216**, 214-218.
- Challet E., Pevet P. 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.
- Challet E., Pevet P., Vivien-Roels B. and Malan A. (1997b) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* **12**, 65-79.
- Challet E., Scarbrough K., Penev P. D. and Turek F. W. (1998) Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J Biol Rhythms* **13**, 410-421.
- Challet E., Turek F. W., Laute M. and O V. R. (2001) Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: role of serotonergic and metabolic signals. *Brain Res* **909**, 81-91.
- Chamas F. M., Underwood M. D., Arango V., Serova L., Kassir S. A., Mann J. J. and Sabban E. L. (2004) Immobilization stress elevates tryptophan hydroxylase mRNA and protein in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry* **55**, 278-283.
- Chan-Palay V., Jonsson G. and Palay S. L. (1978) Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1582-1586.
- Chaouloff F. (1993) Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Brain Res Rev* **18**, 1-32.
- Charara A. and Parent A. (1998) Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* **15**, 111-127.
- Chen D., Buchanan G. F., Ding J. M., Hannibal J. and Gillette M. U. (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13468-13473.
- Cheng M. Y., Bittman E. L., Hattar S. and Zhou Q. Y. (2005) Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci* **6**: 17.
- Cheng M. Y., Bullock C. M., Li C., Lee A. G., Bernak 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.
- Chennaoui M., Drogou C., Gomez-Merino D., Grimaldi B., Fillion G. and Guezennec C. Y. (2001) Endurance training effects on 5-HT(1B) receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosci Lett* **307**, 33-36.
- Chevillard C., Barden N. and Saavedra J. M. (1981) Twenty-four hour rhythm in monoamine oxidase activity in specific areas of the rat brain stem. *Brain Res* **223**, 205-209.
- Chong N. W., Cassone V. M., Bernard M., Klein D. C. and Iuvone P. M. (1998) Circadian expression of tryptophan hydroxylase mRNA in the chicken retina. *Brain Res Mol Brain Res* **61**, 243-250.
- Chou T. C., Scammell T. E., Gooley J. J., Gaus S. E., Saper C. B. and Lu J. (2003) Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* **23**, 10691-10702.

Christensen H. N. (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* **70**, 43-77.

Cintra A., Bhatnagar M., Chadi G., Tinner B., Lindberg J., Gustafsson J. A., Agnati L. F. and Fuxe K. (1994) Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann N Y Acad Sci* **746**, 42-61; discussion 61-3.

Clark J. A., Pai L. Y., Flick R. B. and Rohrer S. P. (2005) Differential hormonal regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the murine dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry* **57**, 943-946.

Clark M. S. and Russo A. F. (1997) Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res* **48**, 346-354.

Cohen Z., Tsuiki K., Takada A., Beaudet A., Diksic M. and Hamel E. (1995) In vivo-synthesized radioactively labelled alpha-methyl serotonin as a selective tracer for visualization of brain serotonin neurons. *Synapse* **21**, 21-28.

Colwell C. S., Foster R. G. and Menaker M. (1991) NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Res* **554**, 105-110.

Colwell C. S., Michel S., Itri J., Rodriguez W., Tam J., Lelievre V., Hu Z., Liu X. and Waschek J. A. (2003) Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R939-49.

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

Cote F., Thevenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoche M. A., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J. and Vodjdani G. (2003) Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13525-13530.

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

Cutrerera R. A., Ouarour A. and Pevet P. (1994b) Effects of the 5-HT<sub>1a</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photic stimuli on the circadian

rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neurosci Lett* **172**, 27-30.

## D

Dahlstrom A. and Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398-399.

Daikoku S., Hisano S. and Kagotani Y. (1992) Neuronal associations in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Comp Neurol* **325**, 559-571.

Dardente H., Menet J. S., Challet E., Tournier B. B., Pevet P. and Masson-Pevet M. (2004) Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res* **124**, 143-151.

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

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

Darmon M. C., Grima B., Cash C. D., Maitre M. and Mallet J. (1986) Isolation of a rat pineal gland cDNA clone homologous to tyrosine and phenylalanine hydroxylases. *FEBS Lett* **206**, 43-46.

Day H. E., Greenwood B. N., Hammack S. E., Watkins L. R., Fleshner M., Maier S. F. and Campeau S. (2004) Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* **474**, 364-378.

Deurveilher S. and Semba K. (2005) Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* **130**, 165-183

De Vries M.J., Nunes Cardozo B., van der Want J., de Wolf A. and Meijer J. H. (1993) Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Res* **612**, 231-237.

## E

- Del Rio M.J., Velez-Pardo C., Ebinger G. and Vauquelin G. (1995) Serotonin binding proteins "SBP": target proteins and tool for in vitro neurotoxicity studies. *Gen Pharmacol* **26**, 1633-1641.
- Descarries L., Watkins K. C., Garcia S. and Beaudet A. (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* **207**, 239-254.
- Deuschle M., Schweiger U., Weber B., Gotthardt U., Korner A., Schmider J., Standhardt H., Lammers C. H. and Heuser I. (1997) Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 234-238.
- Dudley T. E., Dinardo L. A. and Glass J. D. (1999) In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* **81**, 1469-1477.
- Dudley T. E., DiNardo L. A. and Glass J. D. (1998) Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* **18**, 5045-5052.
- Dumas S., Darmon M. C., Delort J. and Mallet J. (1989) Differential control of tryptophan hydroxylase expression in raphe and in pineal gland: evidence for a role of translation efficiency. *J Neurosci Res* **24**, 537-547.
- Duncan M. J., Cheng X. and Heller K. S. (1995) Photoperiodic exposure and time of day modulate the expression of arginine vasopressin mRNA and vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nuclei of Siberian hamsters. *Brain Res Mol Brain Res* **32**, 181-186.
- Duncan M. J., Short J. and Wheeler D. L. (1999) Comparison of the effects of aging on 5-HT7 and 5-HT1A receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res* **829**, 39-45.
- Duncan W. C., Tamarkin L., Sokolove P. G. and Wehr T. A. (1988) Chronic clorgyline treatment of Syrian hamsters: an analysis of effects on the circadian pacemaker. *J Biol Rhythms* **3**, 305-322.
- Eaves M., Thatcher-Britton K., Rivier J., Vale W. and Koob G. F. (1985) Effects of corticotropin releasing factor on locomotor activity in hypophysectomized rats. *Peptides* **6**, 923-926.
- Ebling F. J. (1996) The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* **50**, 109-132.
- Edelstein K. and Amir S. (1999) The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod. *J Neurosci* **19**, 372-380.
- Ehlen J. C., Grossman G. H. and Glass J. D. (2001) In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT7 receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* **21**, 5351-5357.
- Erspamer V. and Asero B. (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* **169**, 800-801.
- Esteban S., Llado J. and Garcia-Sevilla J. A. (1996) Alpha 2-autoreceptors and alpha 2-heteroreceptors modulating tyrosine and tryptophan hydroxylase activity in the rat brain in vivo: an investigation into the alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **353**, 391-399.
- Evrard A., Malagie I., Laporte A. M., Boni C., Hanoun N., Trillat A. C., Seif I., E D. M., Gardier A., Hamon M. and Adrien J. (2002) Altered regulation of the 5-HT system in the brain of MAO-A knock-out mice. *Eur J Neurosci* **15**, 841-851.

## F

- Fairchild G., Leitch M. M. and Ingram C. D. (2003) Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT1A receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* **45**, 925-934.
- Faradji H., Cespuglio R. and Jouvet M. (1983) Voltammetric measurements of 5-hydroxyindole compounds in the suprachiasmatic nuclei: circadian fluctuations. *Brain Res* **279**, 111-119.
- Fediuc S., Campbell J. E. and Riddell M. C. (2006) Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* **100**, 1867-1875.

- Fernstrom J. D., Fernstrom M. H. and Grubb P. E. (1987) Twenty-four-hour variations in rat blood and brain levels of the aromatic and branched-chain amino acids: chronic effects of dietary protein content. *Metabolism* **36**, 643-650.
- Ferraro J. S. and Steger R. W. (1990) Diurnal variations in brain serotonin are driven by the photic cycle and are not circadian in nature. *Brain Res* **512**, 121-124.
- Finocchiaro L. M., Nahmod V. E. and Launay J. M. (1991) Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J* **280 ( Pt 3)**, 727-731.
- Fite K. V., Janusonis S., Foote W. and Bengston L. (1999) Retinal afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and Mongolian gerbils. *J Comp Neurol* **414**, 469-484.
- Florez J. C., Seidenman K. J., Barrett R. K., Sangoram A. M. and Takahashi J. S. (1996) Molecular cloning of chick pineal tryptophan hydroxylase and circadian oscillation of its mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res* **42**, 25-30.
- Florez J. C. and Takahashi J. S. (1996) Quantitative two-dimensional gel electrophoretic analysis of clock-controlled proteins in cultured chick pineal cells: circadian regulation of tryptophan hydroxylase. *J Biol Rhythms* **11**, 241-257.
- Foley T. E., Greenwood B. N., Day H. E., Koch L. G., Britton S. L. and Fleshner M. (2006) Elevated central monoamine receptor mRNA in rats bred for high endurance capacity: implications for central fatigue. *Behav Brain Res* **174**, 132-142.
- Foster R. G., Argamaso S., Coleman S., Colwell C. S., Lederman A. and Provencio I. (1993) Photoreceptors regulating circadian behavior: a mouse model. *J Biol Rhythms* **8 Suppl**, S17-23.
- Foster R. G., Provencio I., Hudson D., Fiske S., W D. G. and Menaker M. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol [A]* **169**, 39-50.
- Francois-Bellan A. M. and Bosler O. (1992) Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. *Brain Res* **595**, 149-153.
- Freedman M. S., Lucas R. J., Soni B., M v. S., Munoz M., David-Gray Z. and Foster R. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* **284**, 502-504.
- Fukuhara C., Brewer J. M., Dirden J. C., Bittman E. L., Tosini G. and Harrington M. E. (2001) Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* **314**, 119-122.
- Fukuhara C., Nishiwaki T., Cagampang F. R. and Inouye S. T. (1994) Emergence of VIP rhythmicity following somatostatin depletion in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **645**, 343-346.
- Fukuhara C., Shinohara K., Tominaga K., Otori Y. and Inouye S. T. (1993) Endogenous circadian rhythmicity of somatostatin like-immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **606**, 28-35.
- Furay A. R., Murphy E. K., Mattson M. P., Guo Z. and Herman J. P. (2006) Region-specific regulation of glucocorticoid receptor/HSP90 expression and interaction in brain. *J Neurochem* **98**, 1176-1184.
- Fuxe K., Harfstrand A., Agnati L. F., Yu Z. Y., Cintra A., Wikstrom A. C., Okret S., Cantoni E. and Gustafsson J. A. (1985) Immunocytochemical studies on the localization of glucocorticoid receptor immunoreactive nerve cells in the lower brain stem and spinal cord of the male rat using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Neurosci Lett* **60**, 1-6.

## G

- Gallager D. W. and Aghajanian G. K. (1976a) Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. II. Reversal by picrotoxin. *Eur J Pharmacol* **39**, 357-364.
- Gallager D. W. and Aghajanian G. K. (1976b) Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. I. Role of adrenergic system. *Eur J Pharmacol* **39**, 341-355.
- Gamrani H., Calas A., Belin M. F., Aguera M. and Pujol J. F. (1979) High resolution radioautographic identification of [3H]GABA labeled neurons in the rat nucleus raphe dorsalis. *Neurosci Lett* **15**, 43-48.
- Gartside S. E., Leitch M. M. and Young A. H. (2003) Altered glucocorticoid rhythm attenuates the ability of a chronic SSRI to elevate forebrain 5-HT: implications for the treatment of depression. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1572-1578.
- 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.
- Gershon M. D., Dreyfus C. F., Pickel V. M., Joh T. H. and Reis D. J. (1977) Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: identification in gut by immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3086-3089.
- Gershon M. D., Liu K. P., Karpiak S. E. and Tamir H. (1983) Storage of serotonin in vivo as a complex with serotonin-binding protein in central and peripheral serotonergic neurons. *J Neurosci* **3**, 1901-1911.
- Gervasoni D., Peyron C., Rampon C., Barbagli B., Chouvet G., Urbain N., Fort P. and Luppi P. H. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* **20**, 4217-4225.
- Gessa G. L., Biggio G., Fadda F., Corsini G. U. and Tagliamonte A. (1974) Effect of the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures on serum tryptophan, brain tryptophan and serotonin metabolism. *J Neurochem* **22**, 869-870.
- Gillespie C. F., EM V. D. B., Mintz E. M., Mickley N. C., Jasnow A. M., Huhman K. L. and Albers H. E. (1999) GABAergic regulation of light-induced c-Fos immunoreactivity within the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* **411**, 683-692.
- Glass J. D., DiNardo L. A. and Ehlen J. C. (2000) Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin release and circadian phase-resetting. *Brain Res* **859**, 224-232.
- Glass J. D., Grossman G. H., Farnbauch L. and DiNardo L. (2003) Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* **23**, 7451-7460.
- Glass J. D., Randolph W. W., Ferreira S. A., Rea M. A., Hauser U. E., Blank J. L. and MJ D. V. (1992) Diurnal variation in 5-hydroxyindole-acetic acid output in the suprachiasmatic region of the Siberian hamster assessed by in vivo microdialysis: evidence for nocturnal activation of serotonin release. *Neuroendocrinology* **56**, 582-590.
- Glass J. D., Selim M. and Rea M. A. (1994) Modulation of light-induced C-Fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists. *Brain Res* **638**, 235-242.
- Glazer E. J., Steinbusch H., Verhofstad A. and Basbaum A. I. (1981) Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. *J Physiol (Paris)* **77**, 241-245.
- Gomez-Merino D., Bequet F., Berthelot M., Chennaoui M. and Guezenec C. Y. (2001) Site-dependent effects of an acute intensive exercise on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in rat brain. *Neurosci Lett* **301**, 143-146.
- Graff C., Challet E., Pevet P. and Wollnik F. (2007) 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated photic-like responses of the circadian clock in the rat. *Neuropharmacology* **52**, 662-671.
- Graff C., Kohler M., Pevet P. and Wollnik F. (2005) Involvement of the retinohypothalamic tract in the photic-like effects of the serotonin agonist quipazine in the rat. *Neuroscience* **135**, 273-283.
- Green C. B., Besharse J. C. and Zatz M. (1996) Tryptophan hydroxylase mRNA levels are regulated by the circadian clock, temperature, and cAMP in chick pineal cells. *Brain Res* **738**, 1-7.
- 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.
- Greenwood B. N., Foley T. E., Day H. E., Burhans D., Brooks L., Campeau S. and Fleshner M. (2005) Wheel running alters serotonin (5-HT) transporter, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and alpha 1b-adrenergic receptor mRNA in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry* **57**, 559-568.
- Groos G. and Hendriks J. (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* **34**, 283-288.
- Grossman G. H., Farnbauch L. and Glass J. D. (2004) Regulation of serotonin release in the Syrian hamster intergeniculate leaflet region. *Neuroreport* **15**, 103-106.
- Grzanna R., Molliver M. E. and Coyle J. T. (1978) Visualization of central noradrenergic neurons in thick sections by the unlabeled antibody method: a transmitter-specific Golgi image. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2502-2506.
- Guillaumond F., Dardente H., Giguere V. and Cermakian N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* **20**, 391-403.

Guldner F. H. and Wolff J. R. (1996) Complex synaptic arrangements in the rat suprachiasmatic nucleus: a possible basis for the "Zeitgeber" and non-synaptic synchronization of neuronal activity. *Cell Tissue Res* **284**, 203-214.

Guy J., Bosler O., Dusticier G., Pelletier G. and Calas A. (1987) Morphological correlates of serotonin-neuropeptide Y interactions in the rat suprachiasmatic nucleus: combined radioautographic and immunocytochemical data. *Cell Tissue Res* **250**, 657-662.

## H

Hagerty T., Morgan W. W., Elango N. and Strong R. (2001) Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* **76**, 825-834.

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

Hannibal J., Ding J. M., Chen D., Fahrenkrug J., Larsen P. J., Gillette M. U. and Mikkelsen J. D. (1998) Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a daytime regulator of the biological clock. *Ann N Y Acad Sci* **865**, 197-206.

Hannibal J., Hindersson P., Knudsen S. M., Georg B. and Fahrenkrug J. (2002) The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* **22**, .

Hannibal J., Moller M., Ottersen O. P. and Fahrenkrug J. (2000) PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* **418**, 147-155.

Hao H. and Schwaber J. (2006) Epidermal growth factor receptor induced Erk phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **1088**, 45-48.

Harfstrand A., Fuxe K., Cintra A., Agnati L. F., Zini I., Wikstrom A. C., Okret S., Yu Z. Y., Goldstein M., Steinbusch H. and et al. (1986) Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9779-9783.

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

Harrington M. E. (1997) The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 705-727.

Harrington M. E., Hoque S., Hall A., Golombek D. and Biello S. (1999) Pituitary adenylate cyclase activating peptide phase shifts circadian rhythms in a manner similar to light. *J Neurosci* **19**, 6637-6642.

Harrington M. E. and Rusak B. (1986) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J Biol Rhythms* **1**, 309-325.

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**, RC11 (1-7).

Hattar S., Kumar M., Park A., Tong P., Tung J., Yau K. W. and Berson D. M. (2006) Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* **497**, 326-349.

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

Hay-Schmidt A., Vrang N., Larsen P. J. and Mikkelsen J. D. (2003) Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat* **25**, 293-310.

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

Hermes M. L., Ruijter J. M., Klop A., Buijs R. M. and Renaud L. P. (2000) Vasopressin increases GABAergic inhibition of rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons in vitro. *J Neurophysiol* **83**, 705-711.

Hickey T. L. and Spear P. D. (1976) Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp Brain Res* **24**, 523-529.

Hillier J. G. and Redfern P. H. (1977) Twenty-four hour rhythms in serum and brain indoleamine concentrations: tryptophan-5-hydroxylase and monoamine oxidase activity in the rat. *Int J Chronobiol* **4**, 197-210.

Hiroi R., McDevitt R. A. and Neumaier J. F. (2006) Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol Psychiatry* **60**, 288-295.

Hisano S., Chikamori-Aoyama M., Katoh S., Kagotani Y., Daikoku S. and Chihara K. (1988) Suprachiasmatic nucleus neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide have synaptic contacts with axons immunoreactive for neuropeptide Y: an immunoelectron microscopic study in the rat. *Neurosci Lett* **88**, 145-150.

Hofer M., Pagliusi S. R., Hohn A., Leibrock J. and Barde Y. A. (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO* **9**, 2459-2464.

Hokfelt T., Fuxe K. and Goldstein M. (1973) Immunohistochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) in central dopamine and 5-hydroxytryptamine nerve cell bodies of the rat. *Brain Res* **53**, 175-180.

Holmes M. C., French K. L. and Seckl J. R. (1997) Dysregulation of diurnal rhythms of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> and corticosteroid receptor gene expression in the hippocampus with food restriction and glucocorticoids. *J Neurosci* **17**, 4056-4065.

Holmes M. C., G D. R., Beckford U., Gillham B. and Jones M. T. (1982) Role of serotonin in the control of secretion of corticotrophin releasing factor. *J Endocrinol* **93**, 151-160.

Horikawa K., Yokota S., Fuji K., Akiyama M., Moriya T., Okamura H. and Shibata S. (2000) Nonphotic entrainment by 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* **20**, 5867-5873.

Horseman N. D. and Ehret C. F. (1982) Glucocorticosteroid injection is a circadian zeitgeber in the laboratory rat. *Am J Physiol* **243**, R373-8.

Hoyer D., Hannon J. P. and Martin G. R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 533-554.

Huhman K. L. and Albers H. E. (1994) Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides* **15**, 1475-1478.

## I

Ibata Y., Takahashi Y., Okamura H., Kubo T. and Kawakami F. (1988) Fine structure of NPY-containing neurons in the lateral geniculate nucleus and their terminals in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Brain Res* **439**, 230-235.

Ichiyama A., Hasegawa H., Tohyama C., Dohmoto C. and Kataoka T. (1976) Some properties of bovine pineal tryptophan hydroxylase. *Adv Exp Med Biol* **74**, 103-117.

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

Ing N.H. (2005) Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod* **72**, 1290-1296.

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.

## J

Jac M., Kiss A., Sumova A., Illnerova H. and Jezova D. (2000) Daily profiles of arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic, supraoptic and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus under various photoperiods. *Brain Res* **887**, 472-476.

Jacobs B. L. and Azmitia E. C. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**, 165-229.

- Jacobs B. L. and Fornal C. A. (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev* **43**, 563-578.
- Jacobs B. L. and Fornal C. A. (1999) Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* **21**, 9S-15S.
- Jacobs B. L. and Fornal C. A. (1997) Serotonin and motor activity. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 820-825.
- Janik D. and Mrosovsky N. (1994) Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res* **651**, 174-182.
- Jankowski M. P. and Sesack S. R. (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* **468**, 518-529.
- Jasper M. S. and Engeland W. C. (1994) Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* **59**, 97-109.
- Jequier E., Robinson D. S., Lovenberg W. and Sjoerdsma A. (1969) Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem Pharmacol* **18**, 1071-1081.
- Jiang Z. G., Allen C. N. and North R. A. (1995) Presynaptic inhibition by baclofen of retinohypothalamic excitatory synaptic transmission in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **64**, 813-819.
- Jiang Z. G., Teshima K., Yang Y., Yoshioka T. and Allen C. N. (2000) Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* **866**, 247-256.
- Jin X., Shearman L. P., Weaver D. R., Zylka M. J., GJ d. V. and Reppert S. M. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**, 57-68.
- Joh T. H., Shikimi T., Pickel V. M. and Reis D. J. (1975) Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3575-3579.
- Johnson R. F., Moore R. Y. and Morin L. P. (1988a) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res* **460**, 297-313.
- Johnson R. F., Moore R. Y. and Morin L. P. (1989) Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull* **22**, 411-422.
- Johnson R. F., Morin L. P. and Moore R. Y. (1988b) Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* **462**, 301-312.
- Johnson R. F., Smale L., Moore R. Y. and Morin L. P. (1988c) Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5301-5304.
- Johnston J. D., Ebling F. J. and Hazlerigg D. G. (2005) Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* **21**, 2967-2974.
- Johnston J. D., Tournier B. B., Andersson H., Masson-Pevet M., Lincoln G. A. and Hazlerigg D. G. (2006) Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology* **147**, 959-965.

## K

- Kalen P., Karlson M. and Wiklund L. (1985) Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H]aspartate tracing. *Brain Res* **360**, 285-297.
- Kalen P., Rosegren E., Lindvall O. and Bjorklund A. (1989) Hippocampal Noradrenaline and Serotonin Release over 24 Hours as Measured by the Dialysis Technique in Freely Moving Rats: Correlation to Behavioural Activity State, Effect of Handling and Tail-Pinch. *Eur J Neurosci* **1**, 181-188.
- Kalen P., Skagerberg G. and Lindvall O. (1988) Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. Evidence for a minor dopaminergic component. *Exp Brain Res* **73**, 69-77.
- Kalsbeek A. and Buijs R. M. (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and tissue research* **309**, 109-118.
- Kalsbeek A., Buijs R. M., JJ v. H., Arts M. and TP v. d. W. (1992) Vasopressin-containing neurons of



the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res* **580**, 62-67.

Kalsbeek A., J v. d. V. and Buijs R. M. (1996a) Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol* **8**, 299-307.

Kalsbeek A., JJ v. H., Wortel J. and Buijs R. M. (1996b) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci* **16**, 5555-5565.

Kalsbeek A., Palm I. F., SE L. F., Scheer F. A., Perreau-Lenz S., Ruitter M., Kreier F., Cailotto C. and Buijs R. M. (2006) SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* **21**, 458-469.

Kamase H. (1980) The diurnal variations of monoamine oxidase activity in discrete nuclei of rat brain. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* **34**, 481-492.

Kan J. P., Chouvet G., Hery F., Debilly G., Mermet A., Glowinski J. and Pujol J. F. (1977) Daily variations of various parameters of serotonin metabolism in the rat brain. I. Circadian variations of tryptophan-5-hydroxylase in the raphe nuclei and the striatum. *Brain Res* **123**, 125-136.

Kanai Y. and Endou H. (2003) Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J Toxicol Sci sciences* **28**, 1-17.

Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E. and Endou H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* **273**, 23629-23632.

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

Kawaguchi M., Scott K. A., Moran T. H. and Bi S. (2005) Dorsomedial hypothalamic corticotropin-releasing factor mediation of exercise-induced anorexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1800-5.

Kawano H., Decker K. and Reuss S. (1996) Is there a direct retina-raphé-suprachiasmatic nucleus pathway in the rat? *Neurosci Lett* **212**, 143-146.

Kim K. S., Wessel T. C., Stone D. M., Carver C. H., Joh T. H. and Park D. H. (1991) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding tryptophan hydroxylase from rat central serotonergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **9**, 277-283.

Kirby L. G., Chou-Green J. M., Davis K. and Lucki I. (1997) The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res* **760**, 218-230.

Kirby L. G., Rice K. C. and Valentino R. J. (2000) Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* **22**, 148-162.

Ko C. H. and Takahashi J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R271-7.

Kohler M., Kalkowski A. and Wollnik F. (1999) Serotonin agonist quipazine induces photic-like phase shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* **14**, 131-140.

Krahn D. D., Gosnell B. A., Levine A. S. and Morley J. E. (1988) Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* **443**, 63-69.

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. *Science* **294**, 2511-2515.

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.

Kume K., Zylka M. J., Sriram S., Shearman L. P., Weaver D. R., Jin X., Maywood E. S., Hastings M. H. and Reppert S. M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.

## L

Laaris N., E L. P., Hamon M. and Lanfumey L. (1997) Stress-induced alterations of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor sensitivity in the rat dorsal raphe nucleus--in vitro electrophysiological evidence. *Fundam Clin Pharmacol* **11**, 206-214.

- Laaris N., E L. P., Laporte A. M., Hamon M. and Lanfumey L. (1999) Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* **91**, 947-958.
- Laaris N., Haj-Dahmane S., Hamon M. and Lanfumey L. (1995) Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT1A autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* **34**, 1201-1210.
- Lall G. S. and Biello S. M. (2003) Neuropeptide Y, GABA and circadian phase shifts to photic stimuli. *Neuroscience* **120**, 915-921.
- Leak R. K., Card J. P. and Moore R. Y. (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res* **819**, 23-32.
- Leathwood P. (1989) Circadian rhythms of plasma amino acids, brain neurotransmitters and behaviour. In: Arendt J., Minors D. S. and Waterhouse J. M. *Biological Rhythms in Clinical Practice*. Wright, Borough Green, Sevenoaks Kent TN15 8PH, England. p: 136-159.
- Lee S. H., Chung S. H., Lee J. S., Kim S. S., Shin H. D., Lim B. V., Jang M. H., Kim H., Kim E. H. and Kim C. J. (2002) Effects of acupuncture on the 5-hydroxytryptamine synthesis and tryptophan hydroxylase expression in the dorsal raphe of exercised rats. *Neurosci Lett* **332**, 17-20.
- Lehman M. N., Silver R., Gladstone W. R., Kahn R. M., Gibson M. and Bittman E. L. (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* **7**, 1626-1638.
- Leitch M. M., Ingram C. D., Young A. H., McQuade R. and Gartside S. E. (2003) Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT1A autoreceptor function in the rat: relevance for depression. *Neuropsychopharmacology* **28**, 119-125.
- Li J. D., Hu W. P., Boehmer L., Cheng M. Y., Lee A. G., Jilek A., Siegel J. M. and Zhou Q. Y. (2006) Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci* **26**, 11615-11623.
- Liang J., 3rd W. J., Iuvone P. M., Tosini G. and Fukuhara C. (2004) Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina. *Neuroreport* **15**, 1497-1500.
- Lim B. V., Jang M. H., Shin M. C., Kim H. B., Kim Y. J., Kim Y. P., Chung J. H., Kim H., Shin M. S., Kim S. S., Kim E. H. and Kim C. J. (2001) Caffeine inhibits exercise-induced increase in tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett* **308**, 25-28.
- Lincoln G. A. and Clarke I. J. (1994) Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* **6**, 251-260.
- Liou S. Y., Shibata S. and Ueki S. (1986) Effect of monoamines on field potentials in the suprachiasmatic nucleus of slices of hypothalamus of the rat evoked by stimulation of the optic nerve. *Neuropharmacology* **25**, 1009-1014.
- Loizou G. and Redfern P. H. (1988) Circadian variation in the uptake of tryptophan by cortical synaptosomes of the rat brain. *Chronobiol Int* **5**, 331-336.
- Long M. A., Jutras M. J., Connors B. W. and Burwell R. D. (2005) Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci* **8**, 61-66.
- Lovenberg T. W., Baron B. M., L d. L., Miller J. D., Prosser R. A., Rea M. A., Foye P. E., Racke M., Slone A. L., Siegel B. W. and et a. I. (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* **11**, 449-458.
- Lovenberg W., Jequier E. and Sjoerdsma A. (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* **155**, 217-219.
- Lowry C. A., Rodda J. E., Lightman S. L. and Ingram C. D. (2000) Corticotropin-releasing factor increases in vitro firing rates of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for activation of a topographically organized mesolimbocortical serotonergic system. *J Neurosci* **20**, 7728-7736.
- Lu H., Ozawa H., Nishi M., Ito T. and Kawata M. (2001a) Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor beta. *J Neuroendocrinol* **13**, 839-845.
- Lu J., Zhang Y. H., Chou T. C., Gaus S. E., Elmquist J. K., Shiromani P. and Saper C. B. (2001b) Contrasting effects of ibotenate lesions of

the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci* **21**, 4864-4874.

Lucki I. (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* **44**, 151-162.

## M

Madhav T. R., Pei Q. and Zetterstrom T. S. (2001) Serotonergic cells of the rat raphe nuclei express mRNA of tyrosine kinase B (trkB), the high-affinity receptor for brain derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res Mol Brain Res* **93**, 56-63.

Makino S., Smith M. A. and Gold P. W. (2002) Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Res* **943**, 216-223.

Malek Z. S., Dardente H., Pevet P. and Raison S. (2005) Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur J Neurosci* **22**, 895-901.

Malek Z. S., Pevet P. and Raison S. (2004) Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience* **125**, 749-758.

Malek Z.S., Sage D., Pevet P. and Raison S. (2006) Hormonal regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA daily rhythm within the rat dorsal and median raphe nuclei. 5th Forum of European Neuroscience. Vienna. Austria. July 8-12, 2006.

Manrique C., Hery F., Faudon M. and Francois-Bellan A. M. (1999) Indirect evidence for an association of 5-HT(1B) binding sites with retinal and geniculate axon terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. *Synapse* **33**, 314-323.

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

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

Maurel D., Sage D., Mekaouche M. and Bosler O. (2000) Glucocorticoids up-regulate the expression

of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia* **29**, 212-221.

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 USA* **96**, 15211-15216.

Maywood E. S., O'Brien J. A. and Hastings M. H. (2003) Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* **15**, 329-334.

Maywood E. S., Okamura H. and Hastings M. H. (2002) Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* **15**, 216-220.

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

McLennan I. S. and Lees G. J. (1978) Diurnal changes in the kinetic properties of tryptophan hydroxylase from rat brain. *J Neurochem* **31**, 557-559.

Medanic M. and Gillette M. U. (1992) Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J Physiol* **450**, 629-642.

Meek J. L. and Neff N. H. (1972) Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *J Neurochem* **19**, 1519-1525.

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

Meyer-Bernstein E. L. and Morin L. P. (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* **16**, 2097-2111.

Meyer-Bernstein E. L. and Morin L. P. (1999) Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience* **92**, 267-279.

- Miguez J. M., Martin F. J., Lema M. and Aldegunde M. (1996) Changes in serotonin level and turnover in discrete hypothalamic nuclei after pinealectomy and melatonin administration to rats. *Neurochem Int* **29**, 651-658.
- Mihai R., Juss T. S. and Ingram C. D. (1994) Suppression of suprachiasmatic nucleus neurone activity with a vasopressin receptor antagonist: possible role for endogenous vasopressin in circadian activity cycles in vitro. *Neurosci Lett* **179**, 95-99.
- Mikkelsen J. D., Larsen P. J., O'Hare M. M. and Wiegand S. J. (1991) Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience* **40**, 55-66.
- Mikkelsen J. D. and Vrang N. (1994) A direct pretectosuprachiasmatic projection in the rat. *Neuroscience* **62**, 497-505.
- Milkovic S., Garrison M.M. and Bates R.W. (1964) Study of the hormonal control of body and organ size in rats with mammatropic tumors. *Endocrinology* **75**, 670-691
- Miller L. P., Pardridge W. M., Braun L. D. and Oldendorf W. H. (1985) Kinetic constants for blood-brain barrier amino acid transport in conscious rats. *J Neurochem* **45**, 1427-1432.
- Mintz E. M., Marvel C. L., Gillespie C. F., Price K. M. and Albers H. E. (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci* **19**, 5124-5130.
- Moga M. M. and Moore R. Y. (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **389**, 508-534.
- Moore R. Y. (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res* **111**, 103-119.
- Moore R. Y. and Card J. P. (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol* **344**, 403-430.
- Moore R. Y. and Eichler V. B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* **42**, 201-206.
- Moore R. Y. and Lenn N. J. (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* **146**, 1-14.
- Moore R. Y. and Speh J. C. (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* **150**, 112-116.
- Moore R. Y., Speh J. C. and Card J. P. (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* **352**, 351-366.
- Moore R. Y., Speh J. C. and Leak R. K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* **309**, 89-98.
- Morimoto M., Morita N., Ozawa H., Yokoyama K. and Kawata M. (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res* **26**, 235-269.
- Morin L. P. (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* **31**, 12-33.
- Morin L. P. and Allen C. N. (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev* **51**, 1-60.
- Morin L. P. and Blanchard J. (1995) Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis Neurosci* **12**, 57-67.
- Morin L. P., Blanchard J. and Moore R. Y. (1992) Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci* **8**, 219-230.
- Morin L. P., Goodless-Sanchez N., Smale L. and Moore R. Y. (1994) Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience* **61**, 391-410.
- Mosko S. S. and Jacobs B. L. (1977) Electrophysiological evidence against negative neuronal feedback from the forebrain controlling midbrain raphe unit activity. *Brain Res* **119**, 291-303.
- Mrosovsky N. (1995) A non-photic gateway to the circadian clock of hamsters. *Ciba Found Symp* **183**, 154-67; discussion 167-7.
- Mrugala M., Zlomanczuk P., Jagota A. and Schwartz W. J. (2000) Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R987-94.

Murakami S., Imbe H., Morikawa Y., Kubo C. and Senba E. (2005) Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res* **53**, 129-139.

## N

Nakamura K., Sugawara Y., Sawabe K., Ohashi A., Tsurui H., Xiu Y., Ohtsuji M., Lin Q. S., Nishimura H., Hasegawa H. and Hirose S. (2006) Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J Neurosci* **26**, 530-534.

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.

Natali J. P., McRae-Degueurce A., Chouvet G. and Pujol J. F. (1980) Genetic studies of daily variations of first-step enzymes of monoamines metabolism in the brain of inbred strains of mice and hybrids. I. Daily variations of tryptophan hydroxylase activity in the nuclei raphe dorsalis, raphe centralis and in the str. *Brain Res* **191**, 191-203.

Neeper S. A., Gomez-Pinilla F., Choi J. and Cotman C. W. (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* **726**, 49-56.

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

## O

Ochi J. and Shimizu K. (1978) Occurrence of dopamine-containing neurons in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Neuroscience letters* **8**, 317-320.

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

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

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

Okamura H. and Ibata Y. (1994) GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neurosci Lett* **181**, 165-168.

Ou X. M., Storrington J. M., Kushwaha N. and Albert P. R. (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem* **276**, 14299-14307.

## P

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

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* **298**, 2213-2216.

Park D. H., Paivarinta H. and Joh T. H. (1989) Tryptophan hydroxylase activity in hypothalamus and brainstem of neonatal and adult rats treated with hydrocortisone or parachlorophenylalanine. *Neurosci Res* **7**, 76-80.

Pasquier D. A. and Villar M. J. (1982) Specific serotonergic projections to the lateral geniculate body from the lateral cell groups of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* **249**, 142-146.

Patel P. D., Pontrello C. and Burke S. (2004) Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol Psychiatry* **55**, 428-433.

Pauwels P. J. (1997) 5-HT 1B/D receptor antagonists. *Gen Pharmacol* **29**, 293-303.

Paxinos, G. & Watson, C. (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. New York.

Penev P. D., Turek F. W., Wallen E. P. and Zee P. C. (1997) Aging alters the serotonergic modulation

of light-induced phase advances in golden hamsters. *Am J Physiol* **272**, R509-13.

Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Garidou M. L., Wortel J., J v. d. V., C v. H., Simonneaux V., Pevet P. and Buijs R. M. (2003) Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci* **17**, 221-228.

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

Pevet P., Jacob N., Lakhdar-Ghazal N. and Vuillez P. (1997) How do the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus integrate photoperiodic information? *Biol Cell* **89**, 569-577.

Peyron C., Luppi P. H., Fort P., Rampon C. and Jouvet M. (1996) Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* **364**, 402-413.

Peyron C., Tighe D. K., AN v. d. P., L d. 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.

Pickard G. E. (1985) Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett* **55**, 211-217.

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

Pickard G. E., Smith B. N., Belenky M., Rea M. A., Dudek F. E. and Sollars P. J. (1999) 5-HT<sub>1B</sub> receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* **19**, 4034-4045.

Pickard G. E., Weber E. T., Scott P. A., Riberdy A. F. and Rea M. A. (1996) 5HT<sub>1B</sub> receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* **16**, 8208-8220.

Pickel V. M. and Chan J. (1999) Ultrastructural localization of the serotonin transporter in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J Neurosci* **19**, 7356-7366.

Piggins H. D., Antle M. C. and Rusak B. (1995) Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker. *J Neurosci* **15**, 5612-5622.

Piggins H. D., Goguen D. and Rusak B. (2005) Gastrin-releasing peptide induces c-Fos in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* **384**, 205-210.

Piggins H. D., Marchant E. G., Goguen D. and Rusak B. (2001a) Phase-shifting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on hamster wheel-running rhythms. *Neurosci Lett* **305**, 25-28.

Piggins H. D. and Rusak B. (1997) Effects of microinjections of substance P into the suprachiasmatic nucleus region on hamster wheel-running rhythms. *Brain Res Bull* **42**, 451-455.

Piggins H. D., Samuels R. E., Coogan A. N. and Cutler D. J. (2001b) Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse, and rat. *J Comp Neurol* **438**, 50-65.

Pinato L., Ferreira Z. S., Markus R. P. and Nogueira M. I. (2004) Bimodal daily variation in the serotonin content in the raphe nuclei of rats. *Biol Rhythms Res* **35**, 245-257.

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.

Poncet L., Denoroy L. and Jouvet M. (1993) Daily variations in in vivo tryptophan hydroxylation and in the contents of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete brain areas of the rat. *J Neural Transm Gen Sect* **92**, 137-150.

Portas C. M., Bjorvatn B., Fagerland S., Gronli J., Mundal V., Sorensen E. and Ursin R. (1998) On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience* **83**, 807-814.

Prasad P. D., Wang H., Huang W., Kekuda R., Rajan D. P., Leibach F. H. and Ganapathy V. (1999) Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 283-288.

Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U. and Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$

controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251-260.

Price M. L. and Lucki I. (2001) Regulation of serotonin release in the lateral septum and striatum by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci* **21**, 2833-2841.

Prosser R. A. (1999) Melatonin inhibits in vitro serotonergic phase shifts of the suprachiasmatic circadian clock. *Brain Res* **818**, 408-413.

Prosser R. A., Edgar D. M., Heller H. C. and Miller J. D. (1994) A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res* **643**, 296-301.

Provencio I., Cooper H. M. and Foster R. G. (1998) Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol* **395**, 417-439.

Provencio I., Rollag M. D. and Castrucci A. M. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* **415**, 493.

Pudovkina O. L., Cremers T. I. and Westerink B. H. (2003) Regulation of the release of serotonin in the dorsal raphe nucleus by alpha1 and alpha2 adrenoceptors. *Synapse* **50**, 77-82.

Pyter L.M., Adelson J.D. and Nelson R.J. (2007) Short Days Increase Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Responsiveness. *Endocrinology*, in press.

## Q

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

Raison S., Rousset C., Pujol J. F. and Weissmann D. (1996) p-Chlorophenylalanine-induced alteration of somatodendritic levels of tryptophan hydroxylase within the rat mesencephalic raphe nuclei. *J Neurochem* **67**, 2124-2133.

Raison S., Weissmann D., Rousset C., Pujol J. F. and Descarries L. (1995) Changes in steady-state levels of tryptophan hydroxylase protein in adult rat brain after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* **67**, 463-475.

Ralph M. R., Foster R. G., Davis F. C. and Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978.

Ramirez A. D., Ramirez V. D. and Meyer D. C. (1987) The nature and magnitude of in vivo 5-hydroxyindoleacetic acid output from 5-hydroxytryptamine terminals is related to specific regions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology* **46**, 430-438.

Rapport M. M., Green A. A. and Page I. H. (1948) Serum vasoconstrictor (serotonine). IV. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **176**, 1243-1251.

Rea M. A., Barrera J., Glass J. D. and Gannon R. L. (1995) Serotonergic potentiation of photic phase shifts of the circadian activity rhythm. *Neuroreport* **6**, 1417-1420.

Rea M. A., Glass J. D. and Colwell C. S. (1994) Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* **14**, 3635-3642.

Recio J., Pevet P. and Masson-Pevet M. (1996) Serotonergic modulation of photically induced increase in melatonin receptor density and Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *J Neuroendocrinol* **8**, 839-845.

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

Reymann K., Pohle W., Muller-Welde P. and Ott T. (1983) Dopaminergic innervation of the hippocampus: evidence for midbrain raphe neurons as the site of origin. *Biomed Biochim Acta* **42**, 1247-1255.

Ribelayga C., Garidou M. L., Malan A., Gauer F., Calgari C., Pevet P. and Simonneaux V. (1999) Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms* **14**, 105-115.

Robichaud M. and Debonnel G. (2005) Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. *J Neuroendocrinol* **17**, 179-185.

Rodriguez J. J., Montaron M. F., Petry K. G., Arousseau C., Marinelli M., Premier S., Rougon G., M L. M. and Abrous D. N. (1998) Complex

regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **10**, 2994-3006.

Roland B. L. and Sawchenko P. E. (1993) Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* **332**, 123-143.

Romijn H. J., Sluiter A. A., Pool C. W., Wortel J. and Buijs R. M. (1997) Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* **9**, 2613-2623.

Rueter L. E. and Jacobs B. L. (1996) Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *Neuroreport* **7**, 1107-1111.

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

Russchen F. T. (1982) Amygdalopetal projections in the cat. II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde tracing techniques. *J Comp Neurol* **207**, 157-176.

## S

Sage D., Ganem J., Guillaumond F., Laforge-Anglade G., Francois-Bellan A. M., Bosler O. and Becquet D. (2004) Influence of the corticosterone rhythm on photic entrainment of locomotor activity in rats. *J Biol Rhythms* **19**, 144-156.

Sakamoto K., Nagase T., Fukui H., Horikawa K., Okada T., Tanaka H., Sato K., Miyake Y., Ohara O., Kako K. and Ishida N. (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem* **273**, 27039-27042.

Sakowski S. A., Geddes T. J., Thomas D. M., Levi E., Hatfield J. S. and Kuhn D. M. (2006) Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res* **1085**, 11-18.

Sanggaard K. M., Hannibal J. and Fahrenkrug J. (2003) Serotonin inhibits glutamate- but not

PACAP-induced per gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Eur J Neurosci* **17**, 1245-1252.

Saper C. B., Lu J., Chou T. C. and Gooley J. (2005a) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* **28**, 152-157.

Saper C. B., Scammell T. E. and Lu J. (2005b) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* **437**, 1257-1263.

Sato T. K., Panda S., Miraglia L. J., Reyes T. M., Rudic R. D., McNamara P., Naik K. A., FitzGerald G. A., Kay S. A. and Hogenesch J. B. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43**, 527-537.

Schaap J., Albus H., VanderLeest H. T., Eilers P. H., Detari L. and Meijer J. H. (2003) Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15994-15999.

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.

Schuhler S., Saboureau M., Pitrosky B. and Pevet P. (1998) In Syrian hamsters, 5-HT fibres within the suprachiasmatic nuclei are necessary for the expression of 8-OH-DPAT induced phase-advance of locomotor activity rhythm. *Neurosci Lett* **256**, 33-36.

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.

Segawa H., Fukasawa Y., Miyamoto K., Takeda E., Endou H. and Kanai Y. (1999) Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* **274**, 19745-19751.

Selim M., Glass J. D., Hauser U. E. and Rea M. A. (1993) Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* **621**, 181-188.

Shearman L. P., Sriram S., Weaver D. R., Maywood E. S., Chaves I., Zheng B., Kume K., Lee



- C. C., GT v. d. H., Hastings M. H. and Reppert S. M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019.
- Shen H. and Semba K. (1994) A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res* **635**, 159-168.
- Sheng Z., Kawano J., Yanai A., Fujinaga R., Tanaka M., Watanabe Y. and Shinoda K. (2004) Expression of estrogen receptors (alpha, beta) and androgen receptor in serotonin neurons of the rat and mouse dorsal raphe nuclei; sex and species differences. *Neurosci Res* **49**, 185-196.
- Shibata S. and Moore R. Y. (1993a) Tetrodotoxin does not affect circadian rhythms in neuronal activity and metabolism in rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res* **606**, 259-266.
- Shibata S. and Moore R. Y. (1993b) Neuropeptide Y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. *Brain Res* **615**, 95-100.
- Shibata S., Tsuneyoshi A., Hamada T., Tominaga K. and Watanabe S. (1992a) Effect of substance P on circadian rhythms of firing activity and the 2-deoxyglucose uptake in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res* **597**, 257-263.
- Shibata S., Tsuneyoshi A., Hamada T., Tominaga K. and Watanabe S. (1992b) Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin<sub>1A</sub> receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res* **582**, 353-356.
- Shibata S., Watanabe A., Hamada T., Ono M. and Watanabe S. (1994) N-methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN in vitro. *Am J Physiol* **267**, R360-4.
- Shieh K. R. (2003) Distribution of the rhythm-related genes *rPERIOD1*, *rPERIOD2*, and *rCLOCK*, in the rat brain. *Neuroscience* **118**, 831-843.
- 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.
- Shinohara K., Isobe Y., Takeuchi J. and Inouye S. T. (1991) Circadian rhythms of somatostatin-immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett* **129**, 59-62.
- Shinohara K., Tominaga K., Isobe Y. and Inouye S. T. (1993) Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J Neurosci* **13**, 793-800.
- Silver R., LeSauter J., Tresco P. A. and Lehman M. N. (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **382**, 810-813.
- 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.
- Singh V. B., Corley K. C., Phan T. H. and Boadle-Biber M. C. (1990a) Increases in the activity of tryptophan hydroxylase from rat cortex and midbrain in response to acute or repeated sound stress are blocked by adrenalectomy and restored by dexamethasone treatment. *Brain Res* **516**, 66-76.
- Singh V. B., Onaivi E. S., Phan T. H. and Boadle-Biber M. C. (1990b) The increases in rat cortical and midbrain tryptophan hydroxylase activity in response to acute or repeated sound stress are blocked by bilateral lesions to the central nucleus of the amygdala. *Brain Res* **530**, 49-53.
- Sitaram B. R. and Lees G. J. (1978) Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* **31**, 1021-1026.
- Siuciak J.A., Boylan C., Fritsche M., Altar C.A. and Lindsay R.M. (1996) BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res* **710**, 11-20.
- Siuciak J. A., Clark M. S., Rind H. B., Whittemore S. R. and Russo A. F. (1998) BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci* **52**, 149-158.
- Smale L., Michels K. M., Moore R. Y. and Morin L. P. (1990) Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res* **515**, 9-19.
- Smart C. M. and Biello S. M. (2001) WAY-100635, a specific 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, can increase the responsiveness of the mammalian circadian

- pacemaker to photic stimuli. *Neurosci Lett* **305**, 33-36.
- Smith B. N., Sollars P. J., Dudek F. E. and Pickard G. E. (2001) Serotonergic modulation of retinal input to the mouse suprachiasmatic nucleus mediated by 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors. *J Biol Rhythms* **16**, 25-38.
- Smith S. A. and Pogson C. I. (1980) The metabolism of L-tryptophan by isolated rat liver cells. Effect of albumin binding and amino acid competition on oxidatin of tryptophan by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem J* **186**, 977-986.
- Sollars P. J., Ogilvie M. D., Rea M. A. and Pickard G. E. (2002) 5-HT<sub>1B</sub> receptor knockout mice exhibit an enhanced response to constant light. *J Biol Rhythms* **17**, 428-437.
- Sollars P. J., Ogilvie M. D., Simpson A. M. and Pickard G. E. (2006a) Photic entrainment is altered in the 5-HT<sub>1B</sub> receptor knockout mouse. *J Biol Rhythms* **21**, 21-32.
- Sollars P. J., Simpson A. M., Ogilvie M. D. and Pickard G. E. (2006b) Light-induced Fos expression is attenuated in the suprachiasmatic nucleus of serotonin 1B receptor knockout mice. *Neurosci Lett* **401**, 209-213.
- Sollars P. J., Smeraski C. A., Kaufman J. D., Ogilvie M. D., Provencio I. and Pickard G. E. (2003) Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Vis Neurosci* **20**, 601-610.
- Sprouse J., Braselton J. and Reynolds L. (2006) Fluoxetine modulates the circadian biological clock via phase advances of suprachiasmatic nucleus neuronal firing. *Biol Psychiatry* **60**, 896-899.
- Sprouse J., Li X., Stock J., McNeish J. and Reynolds L. (2005) Circadian rhythm phenotype of 5-HT<sub>7</sub> receptor knockout mice: 5-HT and 8-OH-DPAT-induced phase advances of SCN neuronal firing. *J Biol Rhythms* **20**, 122-131.
- Sprouse J., Reynolds L., Braselton J. and Schmidt A. (2004a) Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT<sub>5A</sub> receptors? *Synapse* **54**, 111-118.
- Sprouse J., Reynolds L., Li X., Braselton J. and Schmidt A. (2004b) 8-OH-DPAT as a 5-HT<sub>7</sub> agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology* **46**, 52-62.
- Srkalovic G., Selim M., Rea M. A. and Glass J. D. (1994) Serotonergic inhibition of extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclear region assessed using in vivo brain microdialysis. *Brain Res* **656**, 302-308.
- Stamp J. A. and Semba K. (1995) Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res* **677**, 39-49.
- Steinbusch H. W. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* **6**, 557-618.
- 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.
- Sugden D. (2003) Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem* **86**, 1308-1311.
- Sugden D. (1989) Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* **45**, 922-932.
- Sumova A., Jac M., Sladek M., Sauman I. and Illnerova H. (2003) Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol Rhythms* **18**, 134-144.
- Sumova A., Maywood E. S., Selvage D., Ebling F. J. and Hastings M. H. (1996) Serotonergic antagonists impair arousal-induced phase shifts of the circadian system of the syrian hamster. *Brain Res* **709**, 88-96.
- Sun Y. (1989) Indoleamine 2,3-dioxygenase--a new antioxidant enzyme. *Mater Med Pol* **21**, 244-250.
- 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.
- Swanson L. W., Cowan W. M. and Jones E. G. (1974) An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. *J Comp Neurol* **156**, 143-163.

## T

Takahashi Y., Okamura H., Yanaihara N., Hamada S., Fujita S. and Ibata Y. (1989) Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res* **497**, 374-377.

Takumi T., Matsubara C., Shigeyoshi Y., Taguchi K., Yagita K., Maebayashi Y., Sakakida Y., Okumura K., Takashima N. and Okamura H. (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**, 167-176.

Tanaka M., Hayashi S., Tamada Y., Ikeda T., Hisa Y., Takamatsu T. and Ibata Y. (1997) Direct retinal projections to GRP neurons in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* **8**, 2187-2191.

Tanaka M., Ichitani Y., Okamura H., Tanaka Y. and Ibata Y. (1993) The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res Bull* **31**, 637-640.

Tanaka M., Okamura H., Matsuda T., Shigeyoshi Y., Hisa Y., Chihara K. and Ibata Y. (1996) Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: a double labeling in situ hybridization study. *Neurosci Lett* **215**, 119-122.

Tazi A., Swerdlow N. R., LeMoal M., Rivier J., Vale W. and Koob G. F. (1987) Behavioral activation by CRF: evidence for the involvement of the ventral forebrain. *Life Sci* **41**, 41-49.

Tominaga K., Shibata S., Ueki S. and Watanabe S. (1992a) Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters. *Eur J Pharmacol* **214**, 79-84.

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

Tork I. (1985) Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: Paxinos G., editor: The rat nervous system, vol 2. *Sydney Academic Press*. p 43-78.

Tournier B. B., Dardente H., Vuillez P., Pevet P. and Challet E. (2007) Expression of Tgfa in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Neuroscience* **145**, 1138-1143.

Tournier B. B., Menet J. S., Dardente H., Poirel V. J., Malan A., Masson-Pevet M., Pevet P. and

Vuillez P. (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* **118**, 317-322.

Trulsson M. E. and Jacobs B. L. (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* **163**, 135-150.

## U

Uhl G. R. and Reppert S. M. (1986) Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* **232**, 390-393.

## V

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

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

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

Van 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.

Van Hooymissen J. D., Chambliss H. O., Holmes P. V. and Dishman R. K. (2003) Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain Res* **974**, 228-235.

Van Pett K., Viau V., Bittencourt J. C., Chan R. K., Li H. Y., Arias C., Prins G. S., Perrin M., Vale W. and Sawchenko P. E. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* **428**, 191-212.

VanderLeest H. T., Houben T., Michel S., Deboer T., Albus H., Vansteensel M. J., Block G. D. and Meijer J. H. (2007) Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. *Curr Biol* **17**, 468-473.

Vandermaelen C. P. and Aghajanian G. K. (1983) Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* **289**, 109-119.

Varga V., Szekely A. D., Csillag A., Sharp T. and Hajos M. (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurons. *Neuroscience* **106**, 783-792.

Vaynman S., Ying Z. and Gomez-Pinilla F. (2004) Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. *J Neurosci Res* **76**, 356-362.

Vertes R. P. (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **313**, 643-668.

Vertes R. P., Fortin W. J. and Crane A. M. (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **407**, 555-582.

Vertes R. P. and Kocsis B. (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* **340**, 11-26.

Villar M. J., Vitale M. L., Hokfelt T. and Verhofstad A. A. (1988) Dorsal raphe serotonergic branching neurons projecting both to the lateral geniculate body and superior colliculus: a combined retrograde tracing-immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* **277**, 126-140.

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.

Vrang N., Mrosovsky N. and Mikkelsen J. D. (2003) Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res Bull* **59**, 267-288.

## W

Wagner G. C., Johnston J. D., Tournier B. B., Ebling F. J. and Hazlerigg D. G. (2007) Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* **25**, 485-490.

Walther D. J. and Bader M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* **66**, 1673-1680.

Walther D. J., Peter J. U., Bashammakh S., Hortnagl H., Voits M., Fink H. and Bader M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**, 76.

Waselus M., Valentino R. J. and EJ V. B. (2005) Ultrastructural evidence for a role of gamma-aminobutyric acid in mediating the effects of corticotropin-releasing factor on the rat dorsal raphe serotonin system. *J Comp Neurol* **482**, 155-165.

Watts A. G. and Swanson L. W. (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol* **258**, 230-252.

Weber L. J. and Horita A. (1965) A study of 5-hydroxytryptamine formation from L-tryptophan in the brain and other tissues. *Biochem Pharmacol* **14**, 1141-1149.

Weissmann D., Belin M. F., Aguera M., Meunier C., Maitre M., Cash C. D., Ehret M., Mandel P. and Pujol J. F. (1987) Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience* **23**, 291-304.

Weissmann D., Chamba G., Debure L., Rousset C., Richard F., Maitre M. and Pujol J. F. (1990) Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. II. Anatomical distribution of the tryptophan-5-hydroxylase protein and regional variation of its turnover rate. *Brain Res* **536**, 46-55.

Weissmann D., Labatut R., Richard F., Rousset C. and Pujol J. F. (1989) Direct transfer into nitrocellulose and quantitative radioautographic anatomical determination of brain tyrosine hydroxylase protein concentration. *J Neurochem* **53**, 793-799.

Welsh D. K., Logothetis D. E., Meister M. and Reppert S. M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**, 697-706.

Wickland C. and Turek F. W. (1994) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Res* **660**, 293-300.

Wiklund L., Leger L. and Persson M. (1981) Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *J Comp Neurol* **203**, 613-647.

Wollnik F. and Turek F. W. (1989) SCN lesions abolish ultradian and circadian components of activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Am J Physiol* **256**, R1027-39.

## Y

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

Yamamoto S., Shigeyoshi Y., Ishida Y., Fukuyama T., Yamaguchi S., Yagita K., Moriya T., Shibata S., Takashima N. and 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.

Yamazaki S. and Takahashi J. S. (2005) Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. *Methods Enzymol* **393**, 288-301.

Yannielli P. C. and Harrington M. E. (2001) Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* **22**, 547-556.

Yannielli P. and Harrington M. E. (2004) Let there be "more" light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photoc pathways. *Prog Neurobiol* **74**, 59-76.

Ying S. W. and Rusak B. (1997) 5-HT<sub>7</sub> receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* **755**, 246-254.

Ying S. W. and Rusak B. (1994) Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **651**, 37-46.

Ying S. W., Zhang D. X. and Rusak B. (1993) Effects of serotonin agonists and melatonin on photic responses of hamster intergeniculate leaflet neurons. *Brain Res* **628**, 8-16.

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. and Takahashi J. S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5339-5346.

## Z

Zhang X., Beaulieu J. M., Sotnikova T. D., Gainetdinov R. R. and Caron M. G. (2004) Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* **305**, 217.

Zhou F. C., Tao-Cheng J. H., Segu L., Patel T. and Wang Y. (1998) Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res* **805**, 241-254.

Zhou F. C., Xu Y., Bledsoe S., Lin R. and Kelley M. R. (1996) Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. *Brain research. Molecular brain research* **43**, 267-278.

## Résumé

Chez les mammifères, les rythmes biologiques sont générés par une horloge circadienne située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN). Cette horloge fonctionne en phase avec les variations du milieu externe et est synchronisée par le cycle lumière/obscurité mais aussi par des facteurs non photiques. L'horloge des SCN reçoit une innervation thalamique en provenance des feuillets intergenciculés latéraux (IGL), une structure clé du système circadien intervenant dans l'intégration des signaux photiques et non photiques. Les afférences sérotoninergiques (5-HT) issues des noyaux du Raphé médian (RM) et dorsal (RD) innervent respectivement les SCN et les IGL et sont impliquées dans la modulation de l'information photique et dans la transmission des signaux non photiques.

Si l'implication de la 5-HT dans la synchronisation des fonctions rythmiques a fait l'objet de nombreuses études, la régulation de sa synthèse sur une échelle circadienne demeure peu documentée. L'existence d'une telle régulation permettrait de considérer le rôle des noyaux du Raphé comme une structure qui distribue un message temporel. Ainsi, les travaux effectués au cours de cette thèse ont eu pour but d'étudier, dans les neurones sérotoninergiques afférents aux SCN et IGL chez le Rat, un paramètre clé dans la synthèse de 5-HT : la tryptophane hydroxylase (TPH). L'enzyme TPH en effet catalyse la conversion de l'acide aminé tryptophane en 5-hydroxytryptophane, constitue l'étape limitante de la synthèse de 5-HT et contrôle ainsi les quantités intra-neuronales de ce neurotransmetteur.

Dans un premier temps, nous avons analysé sur une échelle de 24 h les profils d'expression de l'ARNm de la TPH2 et des concentrations de protéine TPH à la fois dans les corps cellulaires du RD et du RM et dans les régions de terminaisons sérotoninergiques des SCN et des IGL. Nous avons démontré que ces deux paramètres présentent des variations nyctémérales et que leurs profils rythmiques sont maintenus en obscurité constante, permettant de suggérer l'existence d'une régulation circadienne de la synthèse de 5-HT au sein de ces neurones.

Cette synthèse rythmique et circadienne est donc sous le contrôle de l'horloge principale. Nous avons alors cherché le ou les facteurs à l'origine de la variation circadienne de l'expression de l'ARNm de la TPH2 dans les neurones du Raphé. Deux messagers rythmiques, sous le contrôle des SCN ont été considérés : la sécrétion de corticostérone et l'activité locomotrice.

Nous avons démontré que l'expression rythmique du gène *tph2* dans le RD et le RM est directement contrôlée par la sécrétion de corticostérone. En effet, l'ablation des glandes surrénales induit une suppression de la rythmicité de l'ARNm de la TPH2 et la restauration artificielle du pic nocturne de corticostérone chez des Rats surrénalectomisés rétablit le profil rythmique de cet ARNm.

D'autre part, l'activité locomotrice induite par un accès prolongé à une roue entraîne des modifications de l'expression du gène *tph2*, qui se manifestent par une augmentation des niveaux d'ARNm de la TPH2 à ZT10 (Zeitgeber Time 10), sans pour autant modifier les taux circulants de corticostérone. De plus, l'induction de l'activité locomotrice chez des Rats surrénalectomisés restaure une variation rythmique de l'expression de l'ARNm de la TPH2 dans les deux noyaux du Raphé.

Finalement, nous avons examiné l'influence des conditions photopériodiques sur l'expression journalière du gène *tph2* en exposant des Rats à une photopériode longue ou courte. Nos résultats montrent que les profils journaliers de l'ARNm de la TPH2 sont modifiés en relation avec la photopériode et ce dans les deux noyaux du Raphé, suggérant que le fonctionnement de ces neurones sérotoninergiques pourrait être modulé sur une échelle saisonnière.

Nos résultats ont mis en évidence une rythmicité circadienne de la synthèse de 5-HT dans les voies sérotoninergiques RM→SCN et RD→IGL, qui se traduit par des variations de l'ARNm de la TPH2 et de la protéine TPH. Cette rythmicité est contrôlée par l'horloge principale *via* au moins deux sorties rythmiques, l'une endocrine et l'autre comportementale. Ainsi, la rétroaction de ces deux messagers sur les SCN pourrait s'effectuer *via* les neurones sérotoninergiques du RD et du RM.