

- 
- **Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur,  
Strasbourg I**
- 
- **Discipline : Aspects cellulaires et  
moléculaires de la Biologie**
- 
- **Spécialité : Neurosciences**
- 
- **Par Anthony SALINGRE**
- 

***Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la  
restriction temporelle de la synthèse de mélatonine dans  
la glande pinéale du hamster syrien***

Soutenue le **28 novembre 2008**

**Membres du jury**

---

<b>Directeur de thèse</b>	Dr. <b>Valérie Simonneaux</b> , Directeur de recherche, Strasbourg
<b>Rapporteur interne</b>	Dr. <b>Marie-José Freund-Mercier</b> , Professeur d'Université, Strasbourg
<b>Rapporteur externe</b>	Dr. <b>Anne-Marie François-Bellan</b> , Chargée de recherche, Marseille
<b>Rapporteur externe</b>	Dr. <b>Jack Falcon</b> , Directeur de recherche, Banyul-sur-Mer
<b>Examineur</b>	Dr. <b>Paul Pévet</b> , Directeur de recherche, Strasbourg



# *Remerciements*

Je souhaite tout d'abord remercier le **Dr. Paul PEVET**, pinéalogiste de renom, auprès de qui j'ai beaucoup appris. J'ai particulièrement apprécié la justesse et la pertinence de vos commentaires lors des réunions de labo.

Merci également à la directrice de notre laboratoire (département maintenant), le **Dr. Mireille MASSON-PEVET**, de m'avoir accueilli au sein de cette grande "famille" qu'est le département de Neurobiologie des Rythmes.

Je remercie les **Drs. Jack FALCÓN et Anne-Marie FRANCOIS-BELLAN** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et également le **Pr. Marie-José FREUND-MERCIER**, dont j'ai eu le plaisir de suivre les cours passionnés de physiologie durant mon cursus à la faculté des sciences de la vie de Strasbourg.

Que serait cette rubrique sans une section particulière consacrée à la personne qui m'a encadré durant ces cinq années (DEA et thèse)! Merci **Valérie** pour ton soutien de tous les jours, surtout dans les périodes difficiles (et je ne parle pas que de la rédaction de ce mémoire). Ta motivation, ton dynamisme et ta simplicité m'ont permis d'appréhender cette thèse sous le meilleur aspect possible. J'ai particulièrement apprécié la liberté d'action que tu as laissée dans mon travail, même si parfois celui-ci (et moi aussi) aurait mérité un encadrement plus strict.

J'adresse ici un remerciement particulier à **Paul KLOSEN**, grand maître dans l'art de l'immunohistochimie. Je te dois une bonne partie de la réussite de cette thèse et des connaissances techniques que j'ai pu acquérir. Merci à toi pour cette formation de tous les jours et ta disponibilité en cas de problème.

Merci à tous les membres actuels et passés de l'équipe "pinéale" : **Christiane** pour sa gentillesse et son aide technique, **Marie-Laure** pour m'avoir "embrigadé", mes deux anciens colocataires de bureau, **Mathieu et Florent**, pour les discussions fructueuses, **Laura** toujours aimable et disponible pour donner un coup de main (ou même discuter), **Natalia** pour notre collaboration.

Je n'oublie pas non plus **tous les autres membres du labo** (la liste serait trop longue), avec qui j'ai vraiment passé de très bons moments, notamment **Sylvie, Béatrice, Patrick, Dominique C, VJ et Faffa** pour les pauses "cigarette et café scientifique".

Merci à tous les "**jeunes**" de notre labo et du labo du 2<sup>ème</sup> pour la très bonne ambiance qu'il régnait entre nous : lors des soirées (arrosées ou non) où le seul mot d'ordre était décompression, mais surtout au labo où nous travaillions dans une ambiance joviale (merci surtout pour toutes les crises de rire et le soutien mutuel). Certains de vous comptent encore beaucoup pour moi aujourd'hui (pas de noms comme cela il n'y aura pas de jaloux).

I am especially grateful to **Tony** and **Connie** who have been my bosses during three months in Edmonton. Thanks to you I am now more confident in myself. Many thanks to **Don** for having taught me molecular biology and to **Richard** and **Wendy** for their help. I will never forget the time I have spent in your lab (especially the Canadian Rockies).

Merci à mon meilleur ami **Fredéric** d'être le grand frère que je n'ai jamais eu... Tu as été, tu es et tu seras toujours d'une importance capitale dans ma vie. Merci à sa femme **Corinne** que j'apprécie énormément et à leur fille **Lilly**, ma filleule, qui du haut de ses un an et quelques mois sait déjà comment me faire craquer...

Comment ne pas rendre hommage à mes proches... Merci **maman** pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix quels qu'ils aient été, pour la confiance infinie que tu as en moi et pour tous les sacrifices que tu as pu faire pour mon épanouissement... Ton fils est devenu grand... Bon boulot... Merci à ma grande sœur **Isabelle** et à **Jonathan et Léa**, mes neveux et nièce, pour leur soutien (même inconscient). Je sais que je ne suis pas très présent, mais je vous aime de tout mon cœur (même si je n'ai jamais appris à le dire...) et je n'y serai jamais arrivé sans vous pour me porter...

Merci à **Anne** et **Bernard**, et leurs enfants **Florine, Diane, Renaud** et **Gauthier**, pour m'avoir accepté dans leur "grande famille". Merci également aux autres membres de la grande **famille Jenck**. C'est agréable de se sentir intégré de la sorte...

Enfin, merci à **Emeline** qui partage ma vie de tous les jours. Cela fait 8 ans que tu me supportes et je me demande encore comment tu fais... C'est aussi grâce à toi que j'en suis là...  
**Je t'aime...**

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>3</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>9</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>9</b>
<b>I. De l'horloge au contrôle des rythmes circadiens et saisonniers</b> .....	<b>11</b>
A. Anatomie et fonctionnement endogène de l'horloge .....	12
1. Une structure cérébrale .....	12
2. Propriétés physiologiques de l'horloge .....	12
a) L'horloge moléculaire .....	13
b) Activité électrique endogène .....	16
c) Couplage cellulaire .....	17
B. Synchronisation de l'horloge .....	17
1. Réception des signaux environnementaux .....	18
a) Le tractus rétino-hypothalamique : lien entre horloge et lumière .....	18
b) Les autres afférences .....	18
2. Synchronisation par la lumière .....	19
3. Codage de la longueur du jour par les NSC .....	20
C. Distribution du message temporel .....	22
1. Efférences nerveuses et humorales des NSC .....	22
2. Contrôle des rythmes à la périphérie .....	23
a) Oscillations des gènes horloge à la périphérie .....	23
b) L'horloge centrale est un chef d'orchestre .....	24
D. Horloge et mélatonine : vers un contrôle des rythmes saisonniers .....	26
1. Contrôle de la synthèse de mélatonine par l'horloge .....	26
a) Lien entre la mélatonine, le cycle LD et l'horloge .....	26
b) La voie hypothalamo-pinéale .....	27
2. Sites d'action de la mélatonine .....	28
3. Effets de la mélatonine sur la physiologie saisonnière .....	29
a) Mélatonine et reproduction .....	30
b) Mélatonine et prolactine .....	32
4. Effet de la mélatonine sur l'horloge circadienne .....	33
E. Conclusion : l'horloge et la mélatonine délivrent une information temporelle à l'organisme .....	34
<b>II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères</b> .....	<b>35</b>
A. La glande pinéale, une structure neuroendocrine sous influence .....	35
1. Morphologie et types cellulaires .....	35
2. Afférences nerveuses .....	36
3. Influences endocrines .....	37
4. Influences autocrines/paracrines .....	37
B. La voie de biosynthèse .....	38
1. Du Tryptophane à la 5-HT : TpOH et DAAA .....	39
2. De la 5-HT à la N-acétyl-sérotinine : AA-NAT .....	39
3. De la N-acétyl-sérotinine à la mélatonine : HIOMT .....	43

C. La voie de signalisation noradrénergique .....	44
1. La signalisation $\beta$ -adrénergique .....	45
a) Expression des récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans la glande pinéale.....	46
b) Conséquences de l'activation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	46
2. Signalisation $\alpha$ -adrénergique.....	48
a) Expression des récepteurs $\alpha$ -adrénergiques dans la glande pinéale.....	48
b) Conséquences de l'activation des récepteurs $\alpha$ -adrénergiques.....	50
3. Conséquences sur l'activité des enzymes de synthèse de la mélatonine.....	54
a) Régulation noradrénergique de l'AA-NAT.....	54
b) Régulation noradrénergique de la TpOH et de l'HIOMT .....	57
D. Régulation journalière du rythme de sécrétion de mélatonine.....	57
1. Initiation de la synthèse en début de nuit .....	57
2. Arrêt de la synthèse en fin de nuit.....	59
E. La synthèse de mélatonine au cours des saisons.....	60
1. Variations dans la durée du pic de sécrétion .....	60
2. Variations dans l'amplitude du pic de sécrétion .....	62
F. Conclusion : la NA régule le rythme de synthèse de mélatonine par le contrôle de l'activation de l'AA-NAT .....	63
<b>III. Régulation transcriptionnelle de l'<i>Aa-nat</i> chez les rongeurs .....</b>	<b>64</b>
A. Facteurs de transcription et complexe d'initiation .....	64
B. Le promoteur de l' <i>Aa-nat</i> .....	67
C. Facteurs de réponse à l'AMPC : régulation de l' <i>Aa-nat</i> par les sites CRE .....	69
1. Une structure commune .....	69
2. CREB : un élément activateur.....	70
a) Induction de la transcription .....	70
b) CREB et synthèse de mélatonine .....	71
3. CREM : un modulateur de CREB.....	74
a) Les protéines CREM .....	74
b) ICER réprime l'expression de l' <i>Aa-nat</i> ? .....	76
D. Les protéines du complexe AP-1 : activation ou répression ? .....	78
1. FOS et JUN : interactions et rôles physiologiques.....	79
2. AP-1 et transcription de l' <i>Aa-nat</i> .....	81
E. Les produits des gènes horloge.....	83
F. Des régulateurs en devenir ?.....	85
1. Facteurs activateurs.....	85
2. Facteurs répresseurs .....	86
G. Modifications structurales de la chromatine.....	87
1. Histones et transcription.....	87
2. Histones et glande pinéale.....	88
H. Conclusion : la transcription de l' <i>Aa-nat</i> est régulée par une balance temporelle précise de facteur de transcription activateurs et inhibiteurs .....	89
<b>IV. Restriction temporelle de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien : objectifs de l'étude .....</b>	<b>90</b>
A. Régulation transcriptionnelle nocturne de l' <i>Aa-nat</i> .....	90
B. Restriction diurne de l'induction de l' <i>Aa-nat</i> .....	92
C. Régulation photopériodique de l' <i>Aa-nat</i> .....	93
D. Conclusion.....	94
<b><i>Matériels et méthodes</i> .....</b>	<b>95</b>
<b>I. Animaux et prélèvements des tissus.....</b>	<b>95</b>
A. Stabulation.....	95
B. Prélèvements.....	95

1. Pour l'immunohistochimie .....	95
2. Pour l'hybridation <i>in situ</i> et le Western-Blot .....	96
3. Pour les cultures organotypiques .....	96
<b>II. Immunohistochimie .....</b>	<b>96</b>
A. Inclusion, coupe et montage sur lames .....	96
B. Immunodétection des antigènes .....	97
C. Quantification .....	98
<b>III. Hybridation <i>in situ</i> .....</b>	<b>103</b>
A. Synthèse des ribosondes .....	103
1. Linéarisation des plasmides .....	104
2. Transcription des ribosondes radioactives .....	105
B. Hybridation et détection du signal .....	105
1. Pré-hybridation .....	105
2. Hybridation .....	106
3. Post-hybridation .....	106
4. Autoradiogramme et révélation .....	107
5. Quantification .....	107
<b>IV. Western Blot .....</b>	<b>108</b>
A. Préparation des homogénats et dosage des protéines .....	108
1. Première méthode .....	108
2. Deuxième méthode .....	109
B. Séparation et immunodétection des protéines .....	109
1. Electrophorèse et électrotransfert des protéines .....	109
2. Immunodétection des protéines .....	110
a) Immunoblot .....	110
b) Révélation .....	111
C. Quantification .....	112
<b>V. RT-PCR .....</b>	<b>112</b>
A. Extraction des ARNm et synthèse des ADNc .....	112
B. PCR et détection .....	113
<b>VI. Analyses statistiques .....</b>	<b>114</b>
 <b>Résultats .....</b>	 <b>115</b>
<b>I. Expression et rôle des facteurs AP-1 et de pCREB dans la glande pinéale du hamster syrien .....</b>	<b>116</b>
A. Introduction .....	116
B. Article 1 publié dans <i>Endocrinology</i> en 2006 .....	116
C. Résultats complémentaires .....	117
1. Régulation noradrénergique de c-FOS et de pCREB : induction par des agonistes adrénergiques en début de nuit subjective chez des animaux maintenus en LL. ....	117
2. Régulation noradrénergique de c-FOS : induction par des agonistes adrénergiques en milieu de jour/ jour subjectif en LD et suite à 3 jours en LL. ....	118
<b>II. Restriction diurne et régulation photopériodique de l'expression de l'<i>Aa-nat</i> dans la glande pinéale de hamster syrien .....</b>	<b>120</b>
A. Introduction .....	120
B. Article 2 en cours de publication dans <i>Journal of Neuroendocrinology</i> .....	120

C. Résultats complémentaires .....	121
1. Expression diurne de la protéine ICER après 1 ou 3 jours en LL .....	121
2. Effet d'une injection nocturne de cycloheximide sur l'induction diurne de <i>c-fos</i> et de l' <i>Aa-nat</i> par des agonistes adrénergiques. ....	122
3. Expression photopériodique des protéines c-FOS et pCREB .....	123
<b>III. Etudes <i>ex vivo</i> de la restriction temporelle de l'induction de l'ARN de l'<i>Aa-nat</i> et de la voie de signalisation noradrénergique : mise au point d'un modèle d'étude ? .....</b>	<b>125</b>
A. Introduction .....	125
B. Restriction temporelle de l'induction de <i>c-fos</i> , <i>Icer</i> , l' <i>Aa-nat</i> et de pCREB dans des glandes pinéales en culture <i>ex vivo</i> .....	127
C. Reproduction de la restriction diurne de l'induction de <i>c-fos</i> , <i>Icer</i> et l' <i>Aa-nat</i> et de la phosphorylation de CREB <i>ex vivo</i> . ....	128
 <b><i>Discussion générale / Perspectives</i>.....</b>	<b>133</b>
<b>I. Contrôle nocturne de la transcription de l'<i>Aa-nat</i> chez le rat et le hamster syrien : une balance entre facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs .....</b>	<b>134</b>
A. Réponse à l'AMPc : antagonisme pCREB / ICER.....	135
B. Les protéines AP-1 comme activateur ou répresseur ?.....	138
1. AP-1 et <i>Aa-nat</i> dans la glande pinéale de rat .....	139
2. AP-1 et <i>Aa-nat</i> dans la glande pinéale de hamster syrien .....	144
<b>II. Restriction diurne de la synthèse de mélatonine et de l'<i>Aa-nat</i> chez le hamster syrien : une fenêtre temporelle d'inactivation régulée par des mécanismes multiples ..</b>	<b>147</b>
A. Un mécanisme général.....	147
B. Un rôle pour ICER ?.....	148
C. Un blocage de la signalisation adrénergique ?.....	152
D. Un mécanisme régulé par un oscillateur interne à la glande pinéale? .....	154
<b>III. Contrôle photopériodique de l'expression de l'<i>Aa-nat</i> : une diminution dans l'efficacité de la transcription .....</b>	<b>157</b>
A. Un rôle pour ICER ?.....	158
B. Une diminution de la sensibilité de la voie noradrénergique ?.....	160
<b>IV. Implication de ces mécanismes dans la construction du message photopériodique véhiculé par la mélatonine .....</b>	<b>162</b>
<b>V. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>164</b>
 <b><i>Références bibliographiques</i> .....</b>	<b>167</b>
 <b><i>Annexes</i>.....</b>	<b>191</b>
Table des illustrations .....	191
Liste des publications .....	194
Liste des communications orales et écrites.....	195
Autres articles en co-auteur .....	196

# Abréviations

## **A**

---

AA-NAT : Arylalkylamine-N-acétyltransférase  
ACTH : hormone adrénocorticotrope  
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique  
AP-1 : Activating Protein 1  
ARNm : Acide Ribonucléique messenger  
ATF : Activating Transcription Factor  
AVP : Arginine Vasopressine

## **B**

---

bHLH : basic Helix-Loop-Helix  
BMAL1: Brain and Muscle ARNt Protein 1  
bZIP : "basic Leucine zipper"

## **C**

---

Ca<sup>2+</sup> : calcium  
Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> : calcium intracellulaire  
Ca<sup>2+</sup><sub>e</sub> : calcium extracellulaire  
Ca/CaMK : Calcium/Calmoduline Kinase  
CBP : CREB Binding Protein  
CGR : cellules ganglionnaires de la rétine  
CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide  
CLOCK : Cycle Locomotor Output Cycle Kaput  
CT : Circadian Time  
CRE : cAMP Responsive Element  
CREB : cAMP responsive element binding protein  
CREM : cAMP responsive element modulator  
CRH : Corticotropin Releasing Hormone  
CRX : Cone Rod Homeobox  
CRY : Cryptochrome

## **D**

---

DAAA : Décarboxylase des Acides Aminés  
Aromatiques

DAB : Diaminobenzidine  
DAG : Diacylglycérol  
dbcAMP : dibutyryl-cAMP  
DD : obscurité constante ("Dark/Dark")  
DREAM : Downstream Regulatory Element  
Antagonist Modulator

## **E**

---

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

## **F**

---

FIG : Feuillet Intergéniculés latéraux

## **G**

---

GABA : Acide Gamma Aminobutyrique  
GCS : Ganglions Cervicaux Supérieurs  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

## **H**

---

HDM : Hypothalamus Dorsomédian  
5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine  
HVM : Hypothalamus Ventromédian  
HIOMT : Hydroxyindole-O-méthyltransférase

## **I**

---

ICER : Inducible cAMP Early Repressor  
IP3 : Inositol triphosphate

## **J**

---

JNK : c-JUN N-terminal Kinase

## **K**

---

kD : kiloDalton

## **L**

---

LD: lumière/obscurité ("Light/Dark")

LL : lumière constante ("Light/Light")

LSB : "Laemmli Sample Buffer"

## **M**

---

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MC : Milieu de culture

## **N**

---

NA : noradrénaline

NFκB : Nuclear Factor κB

NF-Y : Nuclear Factor Y

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NOS : Nitric Oxyde Synthase

NPV : Noyaux Paraventriculaires de l'hypothalamus

NPY : Neuropeptide Y

NR : Noyaux du Raphé

NSC : Noyaux Suprachiasmatiques

## **P**

---

PACAP : Pituitary Adenylyl Cyclase Activating Peptide

PAS : Period-ARNT-Sim

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCE : Photoreceptor Constitutive Element

PCR : Polymerase Chain Reaction

pCREB : CREB phosphorylé

PDE : Phosphodiesterase

PEG : Polyéthylène glycol

PER : Period

PIRE : Pineal Responsive Element

PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine Kinase dépendante du Ca<sup>2+</sup>

PKG : Protéine Kinase dépendante du GMPc

PLC : Phospholipase C

Pol II : ARN polymérase II

PT : Pars Tuberalis

PVT : Noyaux Paraventriculaires du Thalamus

## **R**

---

ROR : Retinoic acid related Orphan Receptor

RORE : ROR response Element

RT-PCR : Reverse Transcriptase-PCR

## **S**

---

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

## **T**

---

TBE : Tris Borate EDTA

TBP : TATA Binding Protein

TBS : Tris Buffered Salt

TBHS : Tris Buffered High Salt

TBI : Tris Buffered Imidazole

TF II : Transcription Factor II

TGH : Tractus Géniculo-Hypothalamique

TID/μm<sup>2</sup> : Total Integrated Density / μm<sup>2</sup>

TrpOH : Tryptophane hydroxylase

TRE : TPA Responsive Element

TRH : Tractus Rétino-Hypothalamique

## **V**

---

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

## **Z**

---

ZT : Zeitgeber Time

# *Introduction générale*



## Avant-propos

Nul n'ignore aujourd'hui que la Terre tourne sur elle-même selon un cycle de 24 heures et que cette rotation est la cause directe de **l'alternance du jour et de la nuit** en chaque point géographique de sa surface. Additionné au fait que cet axe est incliné de  $23,4^\circ$  par rapport à l'équateur, la Terre effectue également une rotation autour du Soleil selon une période de 365 jours, créant ainsi une **variation de la durée d'éclairement sur 24h au cours de l'année ou photopériode**. Ces variations annuelles de la photopériode auxquelles s'ajoutent des variations cycliques de l'hygrométrie et de la température déterminent l'alternance des saisons qui est plus ou moins marquée selon la latitude considérée.

Il apparaît essentiel que les êtres vivants puissent **anticiper** ce passage du temps et **adapter** leur activité afin d'assurer leur propre survie et la pérennité des espèces. Ces réponses anticipatrices sont observables d'un point de vue journalier et sont encore plus marquées d'un point de vue saisonnier. Certains animaux subissent des modifications de leur pelage (densité, couleur, etc.) et/ou une augmentation de leur masse corporelle anticipant l'arrivée de l'hiver. Il existe aussi des variations annuelles de la fonction de reproduction, permettant la naissance et surtout le sevrage des petits à la période de l'année la plus propice afin que la progéniture atteigne sa maturité au moment où les conditions climatiques sont les meilleures, et ce quelle que soit la durée de gestation.

Afin d'anticiper ces variations cycliques de l'environnement, les organismes doivent posséder un système leur permettant de se repérer dans le temps. L'information photopériodique étant à la base de ce repérage temporel en terme journalier et saisonnier, un tel système doit donc être capable de **lire, d'intégrer**, mais également de **distribuer** cette information au reste de l'organisme.

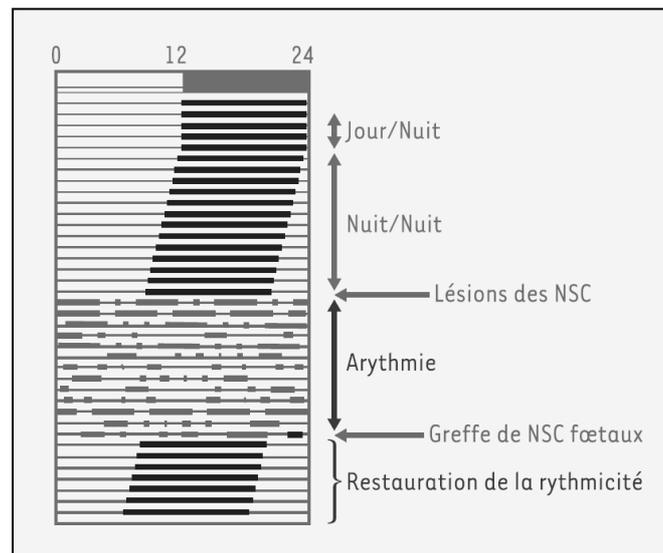
Ce système, contrairement à ce que l'on pourrait penser, ne se contente pas seulement de lire l'information temporelle, mais est capable de **générer** celle-ci de manière endogène sur 24 heures : on parle alors d'**horloge circadienne**. Les facteurs environnementaux "donneurs de temps" (*zeitgeber*), dont le plus puissant est l'alternance jour/nuit de la lumière, ne permettent que de synchroniser cette activité endogène à exactement 24h. De plus, la durée du jour variant avec les saisons, cette horloge est capable de "lire" l'information photopériodique en terme de durée de la phase lumineuse, permettant ainsi d'apporter une information photopériodique complète : journalière (jour/nuit) et saisonnière (jour long/jour court). Cette

information est distribuée à tout l'organisme via des mécanismes nerveux et endocrines complexes. Parmi toutes les structures cibles de l'horloge, **la glande pinéale** a un rôle prépondérant en termes de codage de l'information temporelle. La glande pinéale est une glande endocrine dont le principal produit de sécrétion est la **mélatonine**. Cette hormone est synthétisée et libérée de façon rythmique, sous le contrôle de l'horloge, uniquement pendant la nuit, et de façon proportionnelle à la durée de celle-ci : durée longue lorsque les nuits sont longues et durée courte lorsque les nuits sont courtes. Cette caractéristique fondamentale du rythme de sécrétion de la mélatonine en fait un **donneur de temps journalier et saisonnier** important pour l'organisme. Comme nous le verrons au cours de cette introduction, l'expression temporelle de cette hormone est régulée par l'horloge, mais également par des mécanismes moléculaires précis. En effet, l'expression temporelle des différents acteurs est primordiale à l'établissement du profil temporel de sécrétion.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, l'équipe de Dr. Valérie SIMONNEAUX s'intéressait aux mécanismes internes à la glande pinéale permettant de contrôler la synthèse rythmique de mélatonine, en particulier chez des espèces à physiologie saisonnière comme le hamster syrien. Au cours de ce manuscrit, je décrirai tout d'abord les propriétés du système circadien et saisonnier en commençant par le fonctionnement de l'horloge biologique (synchronisation et distribution des messages), mais en me focalisant surtout sur les rôles de la mélatonine dans ce système et sur le contrôle de son rythme de synthèse par l'horloge. Ensuite je décrirai les mécanismes cellulaires et moléculaires générant le rythme journalier et saisonnier de la synthèse de mélatonine au sein de la glande pinéale des mammifères, des neurotransmetteurs aux voies de signalisations impliquées. Enfin, j'aborderai un aspect particulier aux modèles rongeurs, à savoir la régulation transcriptionnelle de l'enzyme considérée comme limitante de la synthèse de mélatonine, en focalisant mes descriptions essentiellement sur les relations temporelles existant dans l'expression des divers facteurs de transcription stimulateurs et inhibiteurs impliqués. Ces trois parties serviront d'introduction à une quatrième dans laquelle je poserai les questions auxquelles j'ai tenté de répondre au cours de ma thèse, à savoir quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la restriction temporelle de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien, un rongeur à physiologie saisonnière, et en quoi ces mécanismes diffèrent du modèle rongeur couramment décrit qu'est le rat.

## I. De l'horloge au contrôle des rythmes circadiens et saisonniers

Lorsque des rats ou des souris sont maintenus en obscurité constante (DD: "Dark/Dark"), sans repères temporels, ils ont toujours une activité locomotrice rythmique (**figure 1**). Les animaux sont alors en "libre cours", c'est-à-dire que l'activité locomotrice de l'animal suit une période endogène, qui peut être supérieure ou inférieure à 24 heures selon les espèces, mais toujours proche de 24 heures : on parle alors de **rythme circadien**. Les 24 heures circadiennes sont divisées en deux périodes : le jour subjectif (période de repos des animaux nocturnes) et la nuit subjective (période d'activité des animaux nocturnes). Dans le cas d'une période endogène inférieure à 24 heures, la période d'activité de l'animal commencera tous les jours un peu plus tôt (**figure 1**), inversement si elle est supérieure à 24 heures. Par ailleurs, en soumettant ces animaux à un nouveau cycle LD ("Light/Dark"), la période de ce rythme redevient d'exactement 24h : on parle alors de **rythme journalier**. Ces observations ont mis en évidence l'existence d'un système capable d'intégrer et de distribuer le temps circadien : une **horloge circadienne endogène**, qui se synchronise avec l'environnement pour donner à l'organisme une information temporelle d'exactement 24 heures.



**Figure 1** : L'horloge circadienne endogène est située dans les NSC. Représentation schématique d'un actogramme de souris en conditions LD, DD, suite à une lésion puis une greffe des NSC. Les barres noires représentent l'activité locomotrice nocturne. (d'après *Dardente & Cermakian, 2005*)

## **A. Anatomie et fonctionnement endogène de l'horloge**

### **1. Une structure cérébrale**

La lésion bilatérale des noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus abolit le rythme d'activité locomotrice chez des rats en DD (**figure 1**, Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972). Chez ces animaux, ce rythme d'activité peut être restauré par une greffe de NSC (**figure 1**). Par exemple, la greffe de NSC provenant d'un hamster mutant *tau*, possédant une altération de la période endogène (22h chez les hétérozygotes et 20h chez les homozygotes au lieu de 24h ; Ralph & Menaker, 1988), chez un hamster sauvage dont les NSC ont été lésés restaure la rythmicité, mais avec une période endogène correspondant à celle du greffon et non à celle du hamster receveur (Ralph *et al.*, 1990). L'horloge circadienne contrôlant la rythmicité endogène est donc située dans les NSC et impose sa période au reste de l'organisme.

Les NSC sont de petites structures cérébrales situées dans la partie antérieure de l'hypothalamus, juste au dessus du chiasma optique, de part et d'autre du 3<sup>ème</sup> ventricule. Chaque noyau contient 8000 à 10000 neurones (Abrahamson & Moore, 2001; Moore *et al.*, 2002), dont la plupart sont GABAergiques (Moore & Speh, 1993). Les NSC sont subdivisés en une partie ventro-latérale (vlNSC) et une partie dorso-médiane (dmNSC). Les dmNSC sont caractérisés par la présence de neurones à AVP ("Arginine Vasopressine") qui est un peptide exprimé selon un rythme circadien avec un maximum durant le jour (Abrahamson & Moore, 2001; Moore *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 1992). Les neurones des vlNSC expriment majoritairement le VIP ("Vasoactive Intestinal Peptide") avec un maximum durant la nuit en LD, ce rythme n'étant pas circadien (Abrahamson & Moore, 2001; Shinohara *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1989). Par ailleurs l'expression d'autres peptides comme le "Gastrin Releasing peptide", la somatostatine, ou encore la calbindine, permettent d'établir une sous-régionalisation de ces deux subdivisions (Abrahamson & Moore, 2001).

### **2. Propriétés physiologiques de l'horloge**

La greffe de neurones isolés de NSC chez des animaux NSC-lésés restaure une activité rythmique circadienne (Silver *et al.*, 1990), démontrant ainsi que l'information rythmique générée par les NSC naît au cœur même des cellules qui les constituent. Chaque neurone contient toute la machinerie moléculaire nécessaire à la genèse des oscillations. C'est ensuite le couplage entre les neurones qui permet de donner une information rythmique générale.

### a) L'horloge moléculaire

La mise en évidence de l'importance de phénomènes moléculaires dans le fonctionnement de l'horloge vient de l'étude de mutants chez la drosophile qui ont permis d'identifier des gènes essentiels au maintien des oscillations : les gènes horloge. Ces gènes codent des facteurs de transcription interagissant entre eux en une boucle de rétrocontrôle complexe constituant l'horloge moléculaire à la base des oscillations endogènes.

- ***Clock et Bmall: les éléments activateurs de la boucle***

*Clock* ("Circadian Locomotor Output Cycles Kaput") est exprimé dans les NSC de manière constitutive en LD et en DD [ARNm (Sun *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997) et protéine (Maywood *et al.*, 2003)]. Sa mutation entraîne un allongement important de la période endogène d'activité locomotrice, qui devient rapidement arythmique en DD (Antoch *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997b; Vitaterna *et al.*, 1994). *Bmall* ("Brain and Muscle ARNt Protein 1") a une expression rythmique circadienne, avec un maximum durant la nuit (Abe *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 1998a), et sa mutation entraîne une diminution de l'activité locomotrice en LD et une arythmie totale en DD (Bunger *et al.*, 2000).

Ces deux protéines contiennent des domaines bHLH ("basic Helix-Loop-Helix") et PAS ("Period-ARNt-Sim"), leur permettant respectivement de se lier à l'ADN et de se dimériser (Antoch *et al.*, 1997; Hogenesch *et al.*, 1998; King *et al.*, 1997a). Elles s'associent en hétérodimères et activent la transcription en se fixant sur des séquences promotrices, appelées E-box (5'-CACGTG-3'; Gekakis *et al.*, 1998; Hogenesch *et al.*, 1998). Les dimères CLOCK/BMAL1 activent la transcription des autres gènes horloges et d'autres "gènes contrôlés par l'horloge". Cependant, la présence d'une E-box n'est pas un critère suffisant à l'expression rythmique d'un gène. En effet, de nombreux gènes dépourvus d'E-box ont une expression circadienne, alors que d'autres contenant des E-box ne sont pas contrôlés par les dimères CLOCK/BMAL1 (exemple de l'*Aa-nat*, voir **section III.E**).

- ***Per et cry: les éléments répresseurs de la boucle***

Les produits des gènes *per* sont exprimés dans les NSC selon un rythme circadien, les pics d'expression des ARNm de *per1/2/3* étant décalés dans le temps avec un maximum durant le jour (Shearman *et al.*, 1997; Takumi *et al.*, 1998a; Takumi *et al.*, 1998b; Yamamoto *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 1999). Les protéines PER contiennent un domaine PAS mais pas de domaine bHLH, elles ne se lient donc pas à l'ADN. Elles présentent un maximum

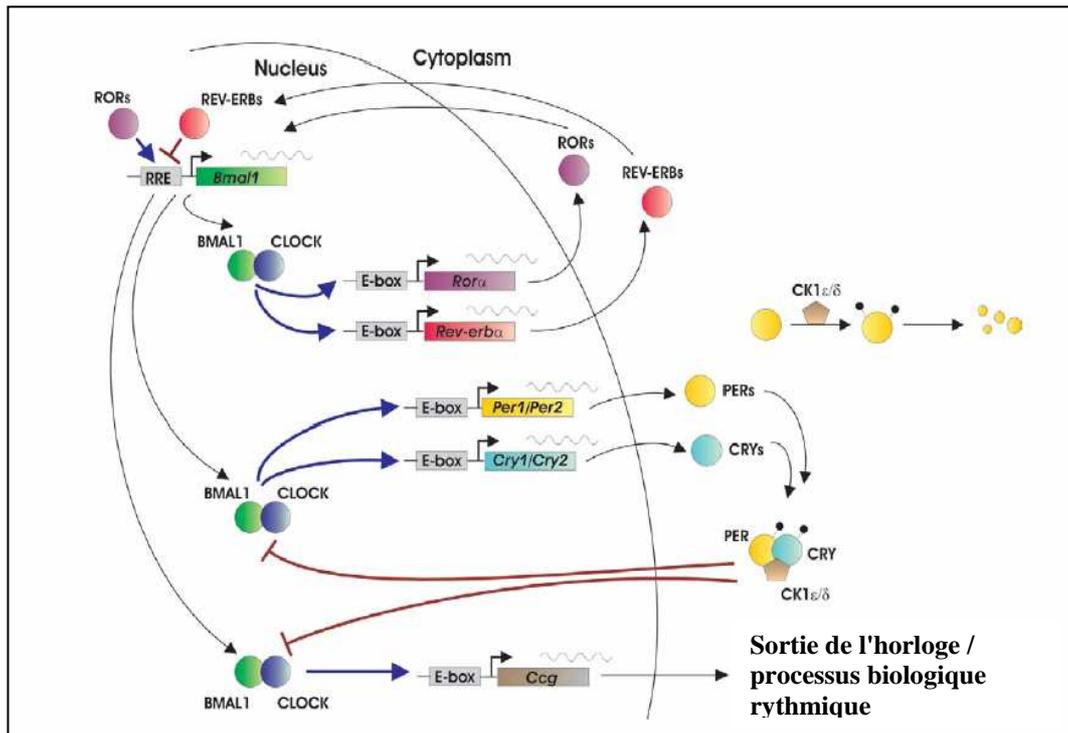
d'expression en début de nuit (Field *et al.*, 2000; Maywood *et al.*, 2003). Les souris mutantes pour *per1/2/3* présentent une diminution de la période endogène par rapport aux souris sauvages en DD, suivie d'une arythmie deux semaines après le passage en DD, sauf pour *per3* (Bae *et al.*, 2001; Cermakian *et al.*, 2001; Shearman *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2001). Les doubles mutants *per1/per2* deviennent immédiatement arythmiques en DD, mais pas les doubles mutants *per1/per3* et *per2/per3*, ce qui souligne le rôle minoritaire de *per3* (Bae *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001).

Les gènes *cry* sont des éléments essentiels de l'horloge moléculaire. Les ARNm de *cry1* sont exprimés selon un rythme circadien avec un maximum en fin de jour (Kume *et al.*, 1999; Okamura *et al.*, 1999), alors que pour *cry2*, les études montrent soit un profil rythmique avec un maximum à la transition jour/nuit (Kume *et al.*, 1999), soit un profil non rythmique (Okamura *et al.*, 1999) en DD. Les protéines CRY sont également exprimées selon un rythme circadien, le maximum d'expression étant à la transition jour/nuit (Kume *et al.*, 1999). Tout comme pour *per*, les souris mutantes pour *cry1/2* présentent une diminution de la période endogène en DD pour les mutants *cry1* ou une augmentation pour *cry2*. Les doubles mutants *cry1/cry2* sont arythmiques en DD (van der Horst *et al.*, 1999), ce qui démontre leur rôle dans la genèse des oscillations au sein des NSC.

L'expression des gènes *per* et *cry* est contrôlée par la fixation de CLOCK/BMAL1 sur les séquences E-box de leurs promoteurs (Bunger *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999). Une fois synthétisées, les protéines PER et CRY forment des hétérodimères inhibant la transcription induite par les dimères CLOCK/BMAL1, réprimant ainsi leur propre synthèse.

- ***Rev-erba* et *Rora*: la boucle secondaire**

En plus de *Clock*, *Bmal1*, *per* et *cry1*, les gènes *Rev-erba* et *Rora* interviennent dans une boucle secondaire permettant de stabiliser la boucle principale. Ils sont exprimés dans les NSC avec un pic en milieu de jour en LD et en DD (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2002), en phase avec l'expression des gènes *per* et *cry* et sous le contrôle de CLOCK/BMAL1. Les protéines REV-ERB $\alpha$  et ROR $\alpha$  entrent en compétition pour les séquences RORE du promoteur du gène *Bmal1* et induisent respectivement une répression ou une activation de la transcription de *Bmal1* (Sato *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2002). Ainsi les souris mutantes pour *Rev-erba* présentent une abolition du rythme de *Bmal1* (Preitner *et al.*, 2002) et celles pour *Rora* une diminution de l'expression (Sato *et al.*, 2004).



**Figure 2 : Représentation schématique des boucles de régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes horloges dans les NSC chez les mammifères.** Les flèches bleues représentent une activation et les flèches rouges une répression. (d'après *Ko & Takahashi, 2006*)

- **Schéma temporel de fonctionnement (figure 2)**

Les décalages temporels dans l'expression des différents acteurs de ces deux boucles sont l'élément crucial permettant les oscillations autoentretenues au sein des neurones des NSC. CLOCK étant exprimé de façon constante, l'activation transcriptionnelle des gènes contenant des E-box dépend essentiellement de l'accumulation et des modifications de la protéine BMAL1 (*Eide et al., 2002; Sanada et al., 2002*), permettant ainsi la translocation du dimère dans le noyau (*Lee et al., 2001*). Il en résulte en fin de nuit et durant le jour une activation de la transcription des autres gènes horloges par CLOCK/BMAL1 (**figure 2**). Les protéines formées s'accumulent dans le cytoplasme et subissent des modifications post-traductionnelles modifiant leur stabilité, ce qui permet de contrôler précisément la période du cycle.

Parmi ces modifications, la phosphorylation de PER par les Caséines Kinases Iε/δ (CKIε/δ) a été la plus étudiée (*Lee et al., 2001; Lowrey et al., 2000*). En l'absence de CRY, les protéines PER sont phosphorylées par les CKIε/δ, ce qui induit leur dégradation. Dès que les protéines CRY sont synthétisées, la formation des trimères PER-CRY-CKIε/δ permet la

stabilisation des protéines PER et la translocation dans le noyau (**figure 2**), où PER-CRY inhibent la transcription de leurs propres gènes et des autres «gènes contrôlés par l'horloge» via l'interaction directe avec les dimères CLOCK/BMAL1 (Kondratov *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2006). Il y a donc, pendant la nuit, une inhibition de la transcription des gènes *per1/2/3*, *cry1/2* et *Rev-erba* au profit de la transcription du gène *Bmal1*. En fin de nuit, les gènes *per* et *cry* présentent leur minimum d'expression, les protéines sont dégradées, levant l'inhibition sur les dimères CLOCK/BMAL1 qui peuvent recommencer un nouveau cycle d'activation. La protéine REV-ERB $\alpha$  amplifie cet effet en inhibant la transcription de *Bmal1* durant le jour, diminuant ainsi la quantité de protéines BMAL1 présentes en début de nuit.

Cette boucle d'auto-régulation moléculaire régule l'expression rythmique de nombreux gènes, comme l'AVP (Jin *et al.*, 1999), ayant des rôles divers dans l'activité électrique et métabolique des neurones des NSC, mais également dans la synthèse et la sécrétion de neuropeptides agissant sur les cibles efférentes (Panda *et al.*, 2002a; Ueda *et al.*, 2002).

### b) Activité électrique endogène

Les neurones des NSC sont également caractérisés par un rythme endogène de leur activité électrique. L'isolation *in situ* des NSC abolit le rythme circadien d'activité électrique des neurones dans tout le cerveau sauf dans les NSC eux-mêmes, démontrant ainsi le caractère endogène de cette activité (Inouye & Kawamura, 1979). *In vitro*, l'activité de ces neurones est toujours rythmique et le reste "indéfiniment" avec un pic d'activité moyenne pendant le jour/jour subjectif (Honma *et al.*, 1998b; Welsh *et al.*, 1995).

L'activité électrique influe sur le fonctionnement rythmique de l'horloge et inversement. En effet, les souris mutantes pour *Clock* ont une période d'activité électrique allongée, tout comme celle de l'activité locomotrice (Herzog *et al.*, 1998). De plus, chez les doubles mutants *cry1/cry2*, ce rythme d'activité électrique est aboli, bien qu'il soit toujours entraînable par le cycle jour/nuit (Albus *et al.*, 2002). Enfin, l'application de tétrodontoxine, un bloquant des canaux sodium dépendant du voltage, sur des tranches de NSC en culture diminue l'expression de PER1 et augmente les déphasages entre les cellules (Quintero *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2003). Les sorties de l'horloge sont également affectées, car une application de tétrodontoxine pendant 4h durant le jour inhibe la transcription et la libération de l'AVP (Abe *et al.*, 1998). La synthèse de l'AVP a donc un lien à la fois avec l'activité électrique des neurones et avec les boucles transcriptionnelles contrôlées par les gènes horloges, confirmant donc le lien réel et direct existant entre ces deux paramètres.

### **c) Couplage cellulaire**

Lorsque les cellules des NSC sont dissociées en culture, elles présentent des rythmes d'activité électrique avec des périodes très hétérogènes (Honma *et al.*, 1998b; Welsh *et al.*, 1995). La moyenne de ces périodes est très similaire à la période d'activité locomotrice endogène (Honma *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 1997b), amenant donc l'hypothèse que les neurones des NSC se synchronisent entre eux et intègrent l'information afin de donner un rythme d'activité général.

Lorsque des tranches de NSC sont mises en culture avec de la tetrodotoxine, la synchronisation entre les décharges électriques (Honma *et al.*, 2000) et l'expression de *Perl* (Yamaguchi *et al.*, 2003) de cellules adjacentes est perdue. Ce couplage ferait intervenir directement les jonctions GAP établies entre les neurones, car l'activité électrique simultanée de deux cellules adjacentes est perdue en culture de tranches de NSC de souris mutantes pour la connexine36 (Long *et al.*, 2005). D'autres mécanismes ont également été proposés comme la synchronisation par le GABA (Liu & Reppert, 2000) ou encore l'intervention des astrocytes dont l'étendue des prolongements, qui présente un rythme journalier, pourrait modifier l'efficacité du couplage synaptique entre les neurones des NSC (Becquet *et al.*, 2008; Welsh & Reppert, 1996). Le VIP serait également important dans la mise en place de ce couplage. En effet, les rythmes d'activité électrique et d'activité locomotrice sont abolis chez les souris mutantes pour le gène *Vpr2* (gène codant le récepteur VPAC2 du VIP ; Aton *et al.*, 2005; Cutler *et al.*, 2003; Harmar *et al.*, 2002), de même que la synchronisation entre les cellules des NSC (Quintero *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2003). De plus, si les vINSC et dmNSC sont mis en culture séparément, les neurones des vINSC (neurones à VIP) restent synchronisés entre eux, mais pas ceux des dmNSC (neurones à AVP ; Yamaguchi *et al.*, 2003).

## **B. Synchronisation de l'horloge**

La période endogène distribuée par l'horloge n'est pas d'exactement 24h : elle est légèrement supérieure ou inférieure selon les espèces. Afin d'assurer une synchronisation parfaite des fonctions physiologiques et comportementales avec le cycle lumière/obscurité, l'horloge doit synchroniser son activité à exactement 24h grâce à de multiples voies d'entrée lui permettant de modifier légèrement son fonctionnement moléculaire en fonction des principaux signaux environnementaux.

## **1. Réception des signaux environnementaux**

### **a) Le tractus rétino-hypothalamique : lien entre horloge et lumière**

Les fibres rétiniennes innervant les NSC sont anatomiquement et fonctionnellement différentes de celles innervant le système visuel. Elles émanent d'une sous-population de cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) formant le tractus rétino-hypothalamique, ne conduisent que l'information lumineuse circadienne et expriment un photopigment spécifique : la mélanopsine (Hannibal, 2002 pour revue). Les souris rendues aveugles par une mutation des photorécepteurs de la rétine sont toujours entraînés par le cycle LD (Freedman *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001), suggérant bien l'intervention d'autres "photorécepteurs" rétiniens dans ce mécanisme. Cependant, les souris mutantes pour la mélanopsine présentent toujours un entraînement au cycle LD (Panda *et al.*, 2002b; Ruby *et al.*, 2002), alors que celles mutantes à la fois pour les photorécepteurs et la mélanopsine n'en présentent plus (Hattar *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2003). Ceci suggère que les CGR à mélanopsine ne sont pas les seules à intervenir, mais que les photorécepteurs "classiques" ont également un rôle restant inconnu pour le moment. Les CGR à mélanopsine projettent directement sur les vlNSC et libèrent du glutamate et du PACAP ("Pituitary Adenylyl Cyclase Activating Peptide") suite à une stimulation lumineuse (Hannibal, 2002 pour revue).

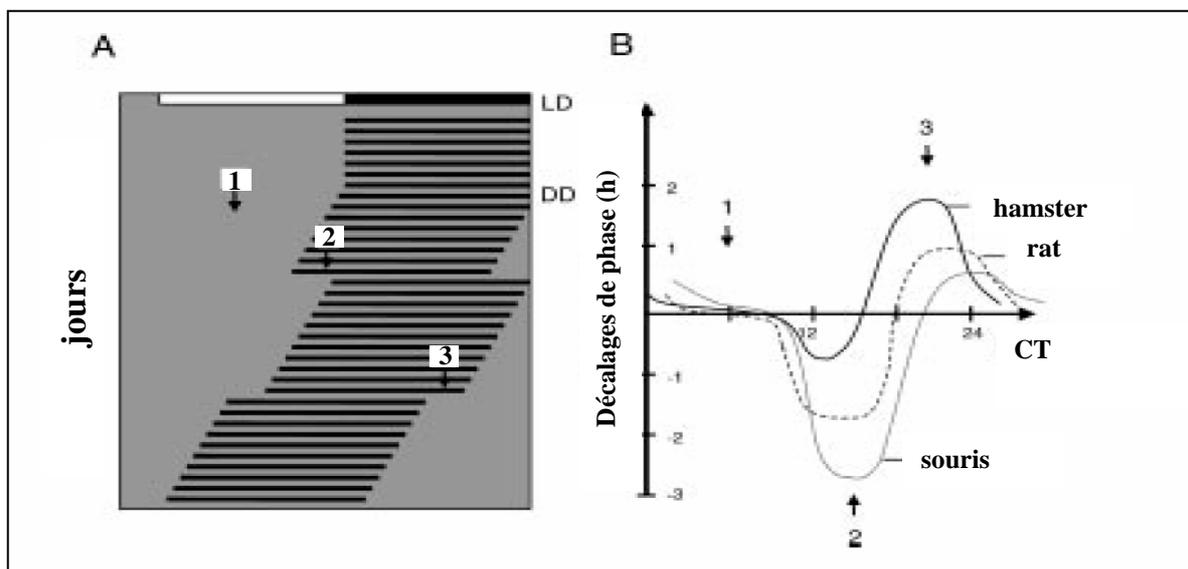
### **b) Les autres afférences**

Les CGR projettent également vers les feuilletts intergénéculés latéraux (FIG), qui étendent en retour des fibres contenant du GABA et du NPY (Neuropeptide Y) sur les vlNSC (Moore & Card, 1994 pour revue). Ce tractus géniculo-hypothalamique n'est pas directement nécessaire à l'entraînement photique, mais module celui-ci, essentiellement aux transitions jour/nuit et nuit/jour (Challet & Pévet, 2003 pour revue). Des fibres sérotoninergiques en provenance des Noyaux du Raphé (NR) se connectent également aux NSC soit directement sur les cellules à VIP à partir du NR médian, soit indirectement sur les FIG à partir du NR dorsal (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Moga & Moore, 1997). Ce tractus est directement impliqué dans l'entraînement de l'horloge par des facteurs comportementaux *via* la libération de sérotonine (5 Hydroxy-tryptamine: 5HT) (Challet & Pévet, 2003 pour revue).

En plus de ces deux afférences, il s'en ajoute d'autres dont le point commun est la connection directe sur les cellules à VIP des vlNSC. Ces derniers fonctionnent comme un centre d'intégration permettant de synchroniser l'horloge par des facteurs photiques et non photiques (comportementaux ou chronobiotiques).

## 2. Synchronisation par la lumière

L'information lumineuse en provenance du tractus rétino-hypothalamique permet la synchronisation des fonctions physiologiques et comportementales à exactement 24 heures en ajustant la phase et la période des oscillations de l'horloge. L'effet de la lumière sur l'horloge est étudié *via* l'application de créneaux lumineux à différents moments du cycle circadien et en mesurant les décalages de phase de l'activité locomotrice. Ceux-ci sont retranscrits sous la forme d'une courbe de réponse de phase (**figure 3**) traduisant la sensibilité de l'horloge à la lumière. Bien qu'il existe des différences entre les espèces, l'effet général est un retard de phase lorsque le créneau est appliqué en début de nuit subjective (l'activité locomotrice commence plus tard le jour suivant), une avance de phase en fin de nuit (l'activité commencera plus tôt) et un effet minimal durant le jour subjectif (Challet & Pévet, 2003; Hannibal, 2002 pour revues).



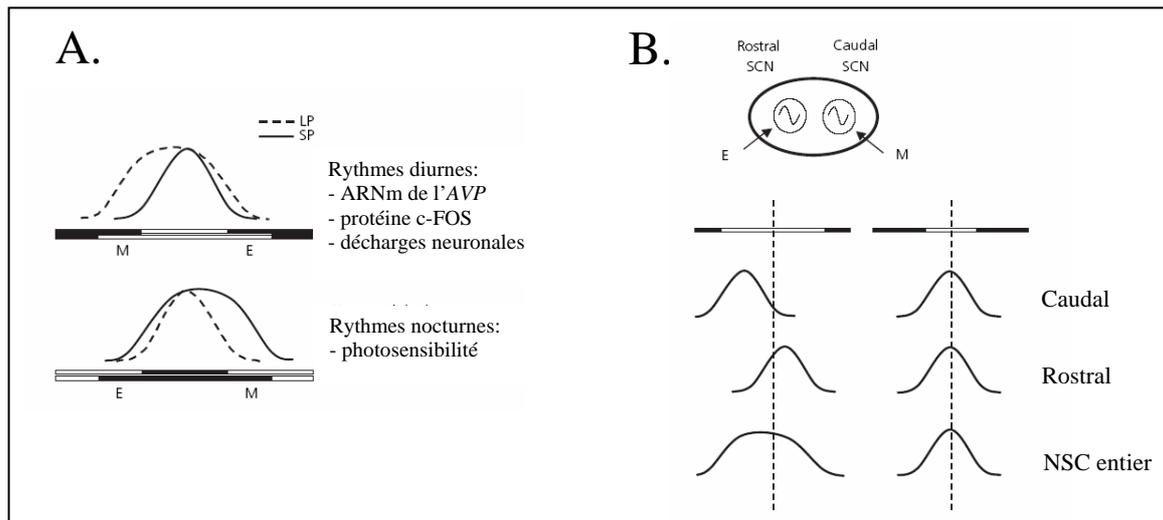
**Figure 3 : Effet de la lumière sur les décalages de phases de l'activité locomotrice à différents moments du cycle circadien.** (A) Les créneaux lumineux appliqués durant le jour subjectif n'ont aucun effet (1), alors qu'ils induisent un retard (2) et une avance (3) de phase de l'activité locomotrice (barres horizontales noires) respectivement en début et en fin de nuit subjective. (B) L'amplitude des décalages obtenus peut être représentée sous la forme d'une courbe de réponse de phase (PRC). Il existe de grandes variations dans cette amplitude en fonction des espèces (ici chez la souris, le rat et le hamster), mais l'allure générale de la courbe reste identique avec toujours les mêmes effets. (d'après Hannibal, 2002)

Le glutamate libéré par les CGR à mélanopsine serait le principal neurotransmetteur conduisant les effets de la lumière sur l'horloge. L'application d'agonistes des récepteurs NMDA du glutamate *in vivo* et *in vitro* mime les effets de la lumière sur l'horloge (Ding *et al.*, 1994; Mintz & Albers, 1997), inversement pour l'application d'antagonistes NMDA (Colwell *et al.*, 1990; Ding *et al.*, 1994). En ce qui concerne le PACAP, son effet reste encore à éclaircir : il produirait des avances de phase durant le jour, mais également en fin de nuit, et il potentialiserait l'effet du glutamate en début de nuit et inhiberait celui-ci en fin de nuit (Gillette & Mitchell, 2002; Hannibal, 2002 pour revues).

L'action des neurotransmetteurs du tractus rétino-hypothalamique induit directement certains gènes par l'activation ou l'inhibition de multiples voies de signalisation dont le point de convergence est la phosphorylation du facteur de transcription CREB ("cAMP Responsive Element Binding Protein") *via* la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), les MAPK ("Mitogen Activated Protein Kinase") ou la Ca/CaMK ("Calcium/Calmodulin dependant protein Kinase") (Gillette & Mitchell, 2002; Hannibal, 2002 pour revues). La lumière induit l'expression de *c-fos*, mais également de *per1* et *per2* dans les NSC. Un créneau lumineux ou l'administration de glutamate induit *per1* à la fois en début et en fin de nuit subjective, alors que *per2* n'est induit qu'en début de nuit subjective (Albrecht *et al.*, 1997; Field *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 1997; Takumi *et al.*, 1998b; Yan *et al.*, 1999; Zylka *et al.*, 1998). D'une manière générale, les retards de phase en début de nuit seraient dus à *per2*, et les avances de phase en fin de nuit à *per1*, mais ceci reste encore sujet à controverse (Albrecht *et al.*, 2001; Bae & Weaver, 2003; Cermakian *et al.*, 2001). *Bmal1* serait également impliqué dans les mécanismes d'entraînement car un créneau lumineux en début ou en fin de nuit subjective diminue l'expression de la protéine BMAL1 (Tamaru *et al.*, 2000). Au contraire des gènes *per*, l'expression des gènes *cry* n'est pas influencée par la lumière (Okamura *et al.*, 1999).

### 3. Codage de la longueur du jour par les NSC

La quantité totale de lumière perceptible sur 24 heures (photopériode) varie en fonction des saisons. Lorsque les jours sont courts et les nuits longues (en hiver) la photopériode est dite courte et lorsque les jours sont longs et les nuits courtes, la photopériode est longue. Cette différence de photopériode est codée par certaines sécrétions endocrines, dont la principale est le rythme saisonnier de production de la mélatonine (voir **section I.D**). Puisque les NSC contrôlent ces sécrétions endocrines, il semble logique que ces derniers soient capables d'intégrer les variations de la photopériode.



**Figure 4 : Intégration de la photopériode par les NSC. (A)** Exemples de rythmes diurnes et nocturnes modifiés par la photopériode au sein des NSC. **(B)** Le codage de la photopériode par les NSC ferait intervenir un oscillateur du matin (M) et un du soir (E) respectivement dans les NSC caudaux et rostraux. Le schéma représente les relations de phases existant entre ces deux oscillateurs ainsi que le signal global obtenu dans les NSC en photopériode longue et en photopériode courte, en prenant pour exemple l'activité électrique. Les barres blanches et noires représentent respectivement le jour et la nuit. (d'après *Johnston, 2005*)

En suivant l'induction de *c-fos* dans les NSC, suite à l'application d'un créneau lumineux à différents moments du cycle circadien chez des animaux préalablement acclimatés en photopériode longue ou photopériode courte, différents auteurs ont observé que la période de photosensibilité nocturne des NSC est plus longue chez les animaux acclimatés en photopériode courte, démontrant ainsi une intégration de la longueur du jour (*Sumová et al., 1995; Vuillez et al., 1996*). De plus, l'expression de nombreux gènes dans les NSC varie en fonction de la photopériode, par exemple *c-fos* (*Sumová et al., 2000*), l'*AVP* (*Jác et al., 2000*) et les gènes horloge (*Messenger et al., 1999; Tournier et al., 2003*). L'activité électrique des NSC est également modifiée, avec une durée globale plus longue et une amplitude plus faible en photopériode longue qu'en photopériode courte (*Mrugala et al., 2000*). Ces mécanismes contribuent à modifier la période d'activité des NSC en fonction de la photopériode ambiante (**figure 4**, *Johnston, 2005* pour revue).

Un modèle a été proposé sur la base d'un découpage des NSC en deux oscillateurs : l'un du matin (M) et l'autre du soir (E), composés chacun par des couples de gènes horloge différents dont la phase d'expression change avec la photopériode (*Daan et al., 2001*).

Cependant, un autre mécanisme impliquant une différence dans le couplage entre la partie rostrale et caudale des NSC a été proposé. En effet, bien que l'activité électrique des NSC soit généralement élevée pendant le jour, deux pics, dont la relation de phase varie en fonction de la photopériode, sont observables sur des tranches horizontales de NSC en culture : l'un en début et l'autre en fin de journée (Jagota *et al.*, 2000). La même expression différentielle entre NSC caudal et rostral existe pour les gènes horloge (Hazlerigg *et al.*, 2005). Ainsi en photopériode longue, les deux pics sont éloignés et il en résulte une activité globale longue et peu ample, alors qu'en photopériode courte, les deux pics sont proches, formant une activité générale courte et ample (**figure 4**).

### **C. Distribution du message temporel**

Pour être fonctionnelle, l'horloge doit véhiculer le message temporel généré à travers l'organisme afin que celui-ci se repère dans le temps et adapte sa physiologie et son comportement (activité locomotrice, température corporelle, prise de nourriture, etc). Chez des animaux ayant subi une lésion des NSC, une greffe de NSC restaure le rythme d'activité locomotrice (Lehman *et al.*, 1987; Silver *et al.*, 1996), mais pas ceux de sécrétion de cortisol ou de mélatonine (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999). Ceci suggère l'implication de facteurs diffusibles dans le contrôle locomoteur, alors que les sécrétions hormonales nécessiteraient plutôt des connexions nerveuses (non restaurées par les greffes). Les NSC contrôlent ainsi les structures cibles *via* des efférences nerveuses et humorales ayant des rôles distincts.

#### **1. Efférences nerveuses et humorales des NSC**

Les projections majeures des NSC se font vers l'aire préoptique médiane, les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (NPV), les noyaux sub-paraventriculaires de l'hypothalamus et l'hypothalamus dorso et ventro-médian (HDM et HVM) (Abrahamson & Moore, 2001; Moore *et al.*, 2002). Il existe d'autres projections en direction des noyaux paraventriculaires du thalamus (PVT), des FIG et du système limbique (septum latéral et noyau du lit de la strie terminale). Pour toutes ces efférences, les messagers principaux sont l'AVP et le GABA, avec des mécanismes différents selon l'organe et la fonction considérés. Par exemple, les NSC contrôlent la sécrétion de cortisol *via* un contrôle direct des neurones endocriniens à CRH ("Corticotropin Releasing Hormone"), situés dans les NPV, par des fibres à AVP (Kalsbeek *et al.*, 1992; Kalsbeek *et al.*, 1996b). Un mécanisme similaire a été

décrit quant à l'action des NSC sur les neurones à GnRH ("Gonadotropin Releasing hormone", (Kalsbeek *et al.*, 2002; Kalsbeek *et al.*, 2006, pour revues).

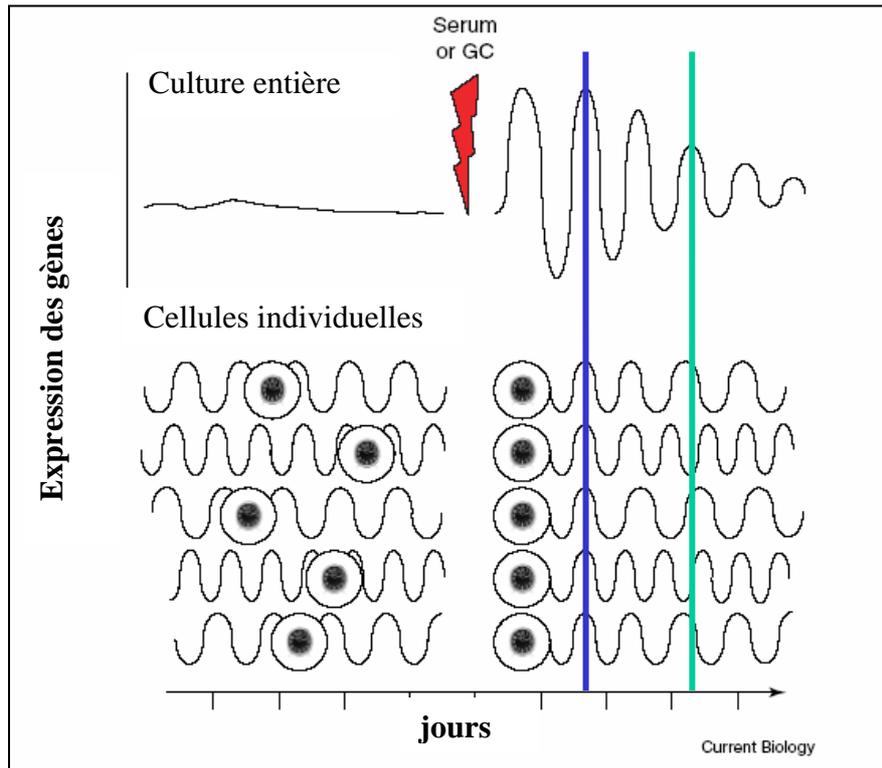
La synchronisation par les NSC implique aussi une communication humorale, puisqu'une greffe de NSC encapsulés dans un polymère, empêchant la régénération axonale, à des animaux NSC-lésés restaure le rythme d'activité locomotrice (Silver *et al.*, 1996). Dans ce cas, deux facteurs pourraient être impliqués : le TGF $\alpha$  ("Transforming Growth Factor") et la "Prokineticin 2" (Cheng *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2001). Tous deux sont exprimés durant le jour dans les NSC, et leur infusion intracérébroventriculaire inhibe l'activité locomotrice (Cheng *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2001). Cependant, pour le TGF $\alpha$ , le rythme d'expression est le même chez les rongeurs nocturnes et diurnes, alors que ces derniers ont une activité locomotrice de jour (Lambert *et al.*, 2005; Tournier *et al.*, 2007). De plus, la mutation du récepteur au TGF $\alpha$  n'inhibe pas le rythme d'activité locomotrice (Kramer *et al.*, 2001).

## 2. Contrôle des rythmes à la périphérie

### a) Oscillations des gènes horloge à la périphérie

Les gènes horloge ne sont pas exprimés que dans les NSC, mais aussi dans d'autres structures centrales et périphériques telles les bulbes olfactifs, la rétine, le foie, les reins, les muscles, etc (Balsalobre, 2002; Reppert & Weaver, 2001). La boucle moléculaire observée est similaire à celle des NSC et régule l'expression rythmique de gènes importants dans le fonctionnement de ces organes. En effet, environ 10% des gènes ont une activité rythmique qui semble soumise à l'alternance jour/nuit (Akhtar *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002a).

Bien qu'une oscillation des gènes horloge soit détectable dans ces organes *ex vivo*, les oscillations ne sont pas constantes et s'amortissent rapidement jusqu'à devenir nulles, alors que pour les NSC, les oscillations persistent pendant plusieurs semaines (Akhtar *et al.*, 2002; Balsalobre *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2000). Néanmoins, dans des fibroblastes en culture, elles peuvent être réinduites par un changement de milieu de culture ou par application de sérum (Balsalobre *et al.*, 1998). De plus, les oscillations s'amenuisent quand on considère les tissus dans leur ensemble, mais chaque cellule prise individuellement conserve des oscillations autoentretenues, même après une longue période de mise en culture (Nagoshi *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2004), suggérant une désynchronisation des cellules entre elles (**figure 5**). Ces études montrent que les cellules en périphérie possèdent des propriétés d'oscillations soutenues et que, contrairement aux NSC, elles sont incapables de se synchroniser entre elles sans intervention extérieure.



**Figure 5 : Les oscillations visibles dans les organes périphériques résultent de la synchronisation des oscillations individuelles des cellules par des facteurs externes.** L'expression des gènes horloge dans des fibroblastes est ici suivie dans la culture entière et dans des cellules individuelles grâce à la luminescence émise par la luciférase couplée au promoteur de *Per2*. Au début de l'expérience (gauche) aucune expression rythmique n'est visible au niveau de la culture entière, alors que chaque cellule individuelle exprime un rythme avec une période qui lui est propre. Suite à la stimulation par du sérum ou des glucocorticoïdes (GC), un rythme est de nouveau visible dans la culture entière (droite). Lors des premiers cycles, chaque cellule exprime un rythme en phase avec les autres (ligne bleue), puis au cours des cycles suivants, les cellules se désynchronisent les unes des autres (ligne verte) et il en résulte une diminution générale de l'amplitude des oscillations au niveau de la culture entière. C'est donc la synchronisation des cellules entre-elles par des facteurs externes (et non l'induction du rythme dans les cellules individuelles) qui permet l'expression d'un rythme global dans la culture. (d'après *Hastings, 2005*)

### b) L'horloge centrale est un chef d'orchestre

Les NSC sont absolument essentiels à la synchronisation des rythmes en périphérie, puisqu'une lésion des NSC abolit les rythmes des gènes horloge dans les organes périphériques (Akhtar *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2000). De plus, la greffe de fibroblastes de souris mutantes pour *per1* chez des souris sauvages montre qu'ils expriment les gènes

horloge selon la même période que les fibroblastes sauvages, alors que celle-ci est plus courte en culture (Pando *et al.*, 2002). Comment l'horloge exerce-t-elle ce contrôle ?

L'application de sérum, mais également de glucocorticoïdes, resynchronise des fibroblastes en culture, notamment l'expression de *Per1* (**figure 5**, Balsalobre *et al.*, 2000). De plus, l'administration de dexaméthasone, un analogue des glucocorticoïdes, chez des souris, induit un décalage de phase de l'expression de *per1* dans le foie, le cœur et les reins (Balsalobre *et al.*, 2000). De même, une surrénalectomie induit une perte de rythmicité d'une centaine de gènes dans le foie (Oishi *et al.*, 2005). Ainsi, les NSC, en contrôlant le rythme de sécrétion des glucocorticoïdes, pourraient contrôler et synchroniser certains rythmes à la périphérie. Cependant, tous les organes ne répondent pas de la même manière à cette influence des facteurs endocrines. En effet, alors qu'une parabiose entre une souris intacte et une souris ayant subi une lésion des NSC rétablit un rythme d'expression de *Per1/2* et *Bmal1* dans le foie et les reins de la souris lésée, ce lien ne rétablit pas ces rythmes dans le cœur et les muscles, suggérant un autre mécanisme dans ces deux structures (Guo *et al.*, 2005). Dans le cas des glandes surrénales, le contrôle du rythme de sécrétion des glucocorticoïdes par les NSC *via* le système nerveux autonome est crucial. Les NSC sont directement reliés aux glandes surrénales via une voie polysynaptique impliquant le système nerveux autonome et permettant un entraînement de la sécrétion des glucocorticoïdes par la lumière (Buijs *et al.*, 1999). De plus, une exposition des animaux à la lumière induit l'expression de *Per1* indépendamment de la libération d'ACTH par l'hypophyse, et une dénervation abolit cet effet (Ishida *et al.*, 2005). La sensibilité des glandes surrénales à l'ACTH semble également dépendante de l'expression des gènes horloges, vu que des souris mutantes *Per2/Cry1* montrent des réponses fortement diminuées à l'ACTH par rapport aux souris sauvages (Oster *et al.*, 2006). L'horloge centrale contrôle cette sensibilité par la synchronisation d'un oscillateur interne *via* le système nerveux autonome, aboutissant ainsi à une synthèse de glucocorticoïde possible seulement à certains moments de la journée.

Les NSC régulent les rythmes à la périphérie par des sécrétions hormonales, mais également par le biais d'un contrôle direct du système nerveux autonome. Les organes périphériques sont plutôt sensibles à l'un ou à l'autre, mais un même organe peut également présenter une différence de sensibilité à l'un et à l'autre en fonction de l'activité considérée (Cailotto *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005; Terazono *et al.*, 2003). Ce contrôle permet de synchroniser les fonctions physiologiques et comportementales avec le cycle jour/nuit, mais également avec les saisons, par exemple par le contrôle de la synthèse de mélatonine.

## **D. Horloge et mélatonine : vers un contrôle des rythmes saisonniers**

La mélatonine est une molécule amphiphile synthétisée uniquement durant la nuit, avec une durée proportionnelle à celle-ci, que les animaux soient diurnes ou nocturnes (Goldman, 1999; Goldman, 2001; Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revues). Le rythme de mélatonine plasmatique reflète exactement le rythme de synthèse car elle est directement sécrétée dans la circulation sanguine et sa demi-vie est courte (20 minutes chez le rat, 40 minutes chez l'homme). Les variations photopériodiques du pic nocturne de mélatonine (long en photopériode courte et court en photopériode longue) en font un messager important pour le fonctionnement rythmique des organismes (Goldman, 1999; Reiter, 1993b, pour revues). Bien que sa production ait été décrite dans d'autres structures comme la rétine ou la glande de Harder, la glande pinéale est le site de synthèse le plus important, puisqu'une pinéalectomie abolit le rythme plasmatique de mélatonine (Lewy *et al.*, 1980).

### **1. Contrôle de la synthèse de mélatonine par l'horloge**

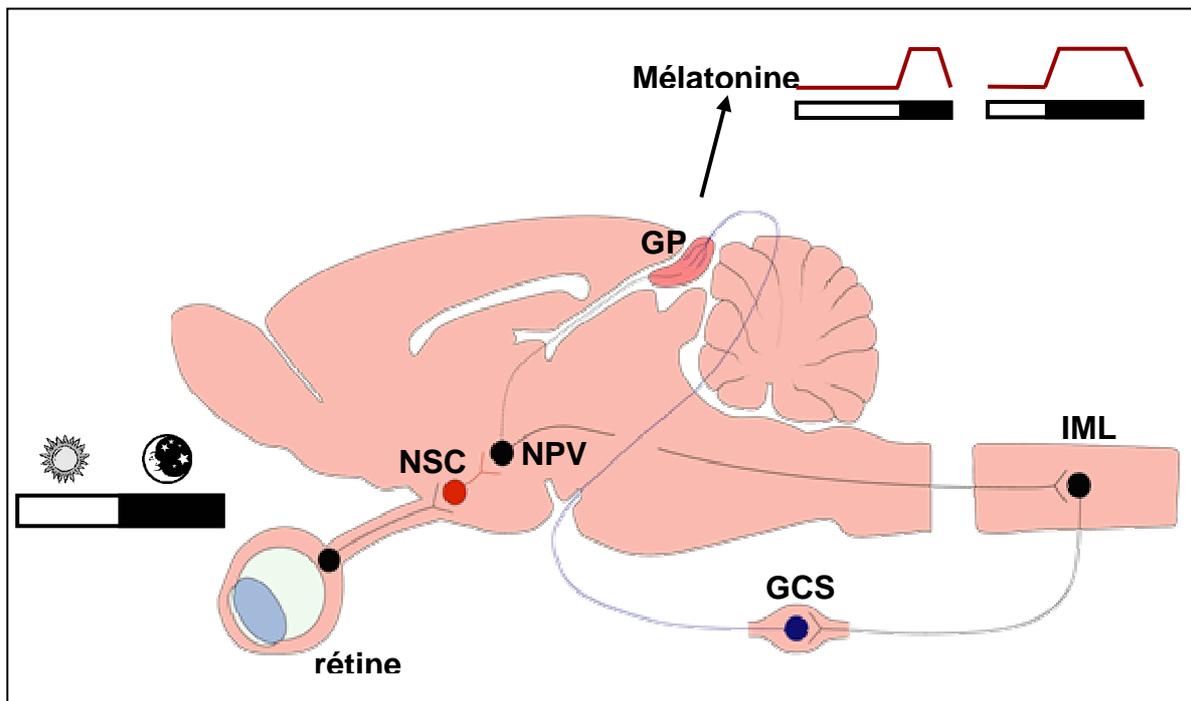
#### **a) Lien entre la mélatonine, le cycle LD et l'horloge**

La synthèse de mélatonine par la glande pinéale est directement régulée par le cycle LD. En effet, le profil de sécrétion de mélatonine et l'activité de l'enzyme principale régulant sa synthèse (voir **section II**) changent en fonction de la durée de la nuit et sont inhibés lorsque les animaux sont soumis à une lumière constante (LL) ou à un créneau de lumière durant la nuit (Illnerová *et al.*, 1979; Klein & Weller, 1970; Klein & Weller, 1972). La persistance du rythme de sécrétion de mélatonine en DD permettait déjà de supposer que les NSC étaient le lien entre le cycle LD et la mélatonine. La lésion des NSC n'abolit pas seulement le rythme d'activité locomotrice, mais également le rythme de sécrétion de la mélatonine et de ses enzymes de synthèse chez de nombreuses espèces de mammifères (Bittman *et al.*, 1989; Klein & Moore, 1979; Lehman *et al.*, 1984; Moore & Klein, 1974; Reppert *et al.*, 1981; Tessonnaud *et al.*, 1995). De plus, chez le hamster *tau*, le rythme endogène de mélatonine suit parfaitement la période endogène distribuée par l'horloge (Lucas *et al.*, 1999). Mais les NSC ne seraient pas les seuls responsables de l'effet de la lumière sur la synthèse de mélatonine. Une exposition à la lumière pendant la nuit possède deux composantes : une dépendante de l'horloge et une indépendante passant probablement par les FIG (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Cependant le contrôle par les NSC reste le plus important en termes d'initiation et d'arrêt de la synthèse de mélatonine (voir **section II**).

### b) La voie hypothalamo-pinéale

La glande pinéale est contrôlée par les NSC *via* une voie polysynaptique passant par les NPV, les colonnes intermédiolatérales de la moelle épinière et les ganglions cervicaux supérieurs (GCS) (Larsen *et al.*, 1998; Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999). Elle constitue la voie rétino-hypothalamo-pinéale (**figure 6**).

Les NPV sont un relais très important, car une lésion de ceux-ci abolit le rythme de mélatonine (Bittman *et al.*, 1989; Lehman *et al.*, 1984; Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Il est intéressant de constater que les rythmes de mélatonine et de libération d'AVP par les NSC sont en antiphase, ce qui avait laissé supposer un rôle inhibiteur de l'AVP sur la synthèse de mélatonine de jour. Cependant, une microinjection d'AVP dans les NPV de nuit n'a aucun effet inhibiteur (Kalsbeek *et al.*, 2000; Kalsbeek *et al.*, 1993). En revanche, l'infusion d'un antagoniste du GABA dans les NPV stimule la synthèse de mélatonine de jour et l'inhibe de nuit (Kalsbeek *et al.*, 1999; Kalsbeek *et al.*, 1996a; Kalsbeek *et al.*, 2000).



**Figure 6** : Schéma de la voie de transmission du signal lumineux vers la glande pinéale représenté sur une coupe sagittale de cerveau de rat. GCS : ganglions cervicaux supérieurs ; GP : glande pinéale ; IML : colonne intermédiolatérale de la moelle épinière ; NPV : noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus ; NSC : noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus. La barre blanche et noire représente l'alternance jour/nuit de la lumière.

La lésion des NSC abolit le rythme de sécrétion de mélatonine, mais augmente les niveaux de base pendant le jour, qui correspondent dans ce cas à environ 30% des valeurs nocturnes observées chez des animaux intacts (Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Ceci confirme le rôle inhibiteur des NSC durant le jour et constamment stimulateur des NPV. Cependant, les valeurs nocturnes chez ces animaux sont identiques à celles de jour, montrant donc que les NSC n'ont pas qu'une action inhibitrice durant le jour, mais également une action stimulatrice nocturne. Celle-ci dépend essentiellement du glutamate, car l'application d'un antagoniste des récepteurs NMDA dans les NPV durant la nuit subjective entraîne une diminution de la synthèse de mélatonine (Perreau-Lenz *et al.*, 2004). Ainsi les NSC assurent un contrôle très strict sur la glande pinéale *via* une inhibition diurne et une stimulation nocturne des NPV.

Les NPV projettent des fibres contenant de l'ocytocine et de l'AVP en direction des trois segments supérieurs de la moelle épinière pour rejoindre les colonnes intermédiolaterales (Larsen, 1999; Larsen *et al.*, 1998; Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1997). Ces dernières, éléments préganglionnaires, innervent les GCS dans leur partie rostrale (Reuss *et al.*, 1989; Strack *et al.*, 1988) *via* des fibres majoritairement cholinergiques (Kasa *et al.*, 1991). Le dernier relais que sont les GCS constitue un élément activateur sympathique dont 1% des neurones environ innervent la glande pinéale (Larsen, 1999). Les fibres sympathiques forment un réseau dense pénétrant dans la glande pinéale *via* le nerf conarien. Elles contiennent majoritairement de la noradrénaline (NA), mais également de la dopamine et du NPY.

## **2. Sites d'action de la mélatonine**

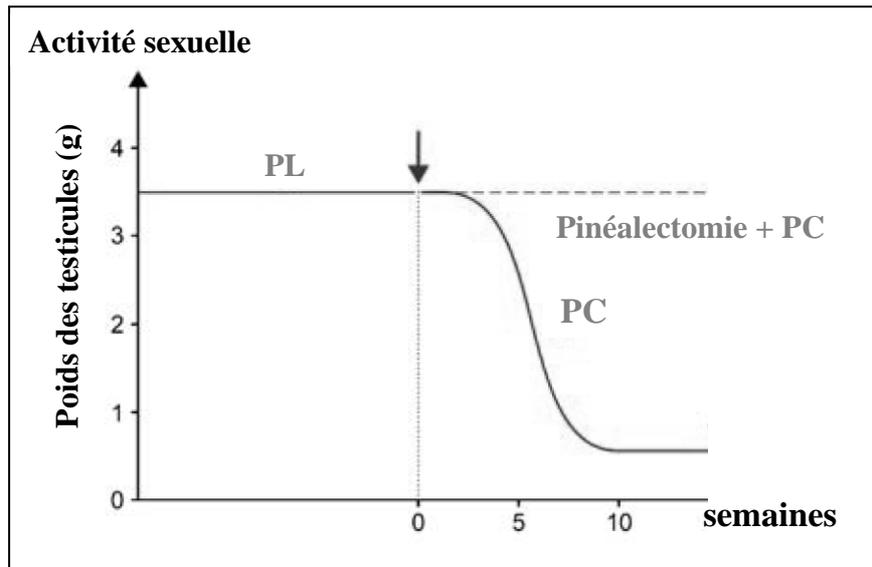
Le message hormonal délivré par la mélatonine est acheminé vers les structures centrales et périphériques *via* sa libération dans le système sanguin, mais également directement dans le liquide céphalo-rachidien (Malpaux *et al.*, 2001; Tricoire *et al.*, 2002; Tricoire *et al.*, 2003). Chez toutes les espèces de mammifères, plus de 100 structures cérébrales et 30 structures périphériques possèdent des sites de liaison à la mélatonine (Masson-Pévet *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1994; Vanecek, 1998, pour revues). En ce qui concerne les structures centrales, ils sont présents dans les HDM et HVM, l'aire préoptique médiane, les PVT, la rétine, les NSC et la PT. Cependant, il existe une grande variabilité dans la localisation et le nombre de structures marquées, ainsi que dans l'intensité du marquage des différentes structures chez une même espèce et d'une même structure entre espèces. Parmi toutes les structures marquées, seules les NSC et la PT sont communes à toutes les espèces, avec un marquage plus important dans la PT (Masson-Pévet *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1994, pour revues).

Les sites de liaison à la mélatonine sont classés en deux familles selon leurs propriétés pharmacologiques : les sites de liaison à haute affinité ( $K_d < 200 \text{ pM}$ ) et à faible affinité ( $K_d$  environ  $10 \text{ nM}$ ). Trois sites de liaison à haute affinité ont été définis comme des récepteurs : MT1, MT2 et Mel1c, ce dernier n'étant exprimé que chez les vertébrés non-mammaliens (Reppert *et al.*, 1996; von Gall *et al.*, 2002b, pour revues). MT1 (Reppert *et al.*, 1994) et MT2 (Reppert *et al.*, 1995) sont des récepteurs couplés à une protéine G inhibitrice de l'Adénylate Cyclase. Cependant, d'autres signalisations ont été décrites, impliquant le GMPc (pour les MT2), le diacylglycérol (DAG), l'inositol triphosphate (IP3) et le calcium intracellulaire ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (New *et al.*, 2003; Vanecek, 1998; von Gall *et al.*, 2002b). Les récepteurs MT1 sont majoritairement exprimés dans les NSC, la PT et le cerveau, alors que les MT2 apparaissent plus spécifiques de la rétine (Reppert *et al.*, 1995; Reppert *et al.*, 1994). Chez l'homme, seul le MT1 s'exprime dans les NSC (Weaver & Reppert, 1996), alors que chez le rat, le récepteur MT2 s'exprime également (Wan *et al.*, 1999). De plus, chez les hamsters syrien et sibérien, le récepteur MT2 n'est pas exprimé (Weaver *et al.*, 1996).

Les sites de liaison à faible affinité, MT3, correspondent à une enzyme cytosolique, la Quinone Réductase 2, impliquée dans des mécanismes d'oxydo-réduction, expliquant les propriétés anti-oxydantes de la mélatonine (Nosjean *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2007).

### 3. Effets de la mélatonine sur la physiologie saisonnière

La plupart des animaux à reproduction saisonnière utilisent les variations annuelles de la photopériode pour se repérer dans l'année et ainsi anticiper les variations environnementales grâce au système de mesure du temps qu'est le rythme de sécrétion de mélatonine contrôlé par l'horloge des NSC (Malpaux *et al.*, 2001; Malpaux *et al.*, 1999; Pévet, 1988; Pévet, 2003, pour revues). En fonction de la période de reproduction, les animaux sont classés en deux catégories : les animaux de jour long qui se reproduisent au printemps/été et ont une durée de gestation courte (exemple du hamster syrien) et les animaux de jours courts qui se reproduisent en automne/hiver (exemple du mouton). Dans chaque cas, il existe une photopériode critique en dessous ou au dessus de laquelle les animaux sont sexuellement inactifs ou actifs. Chez le hamster syrien, par exemple, cette photopériode critique est de 12h30 de lumière par jour. En dessous de cette valeur, l'organisme interprète le signal lumineux comme une photopériode courte et il en résulte une inhibition de la reproduction se manifestant par une diminution de la biosynthèse des hormones gonadiques, et une atrophie des gonades (**figure 7**, Gaston & Menaker, 1967; Pévet, 1988).



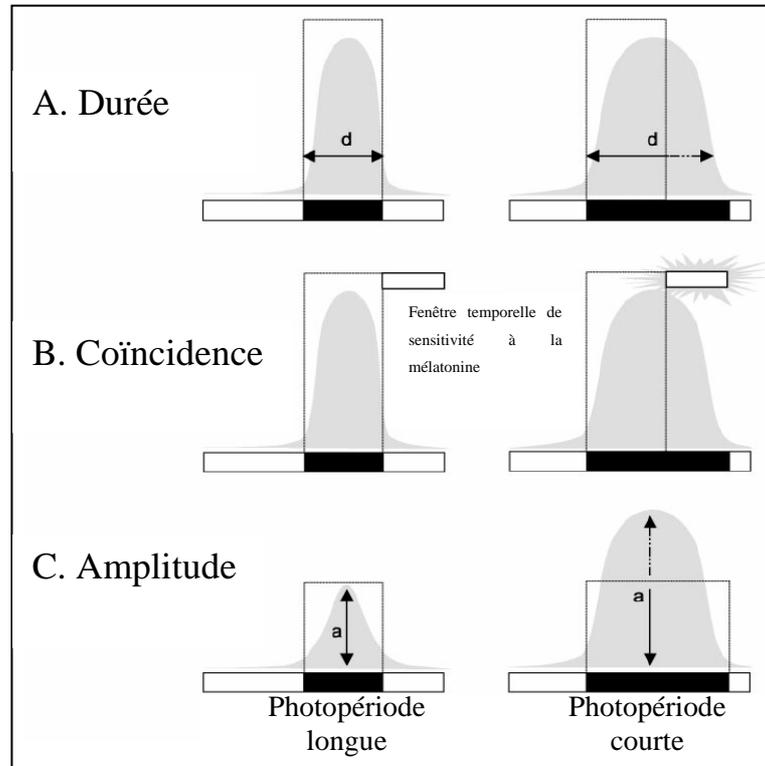
**Figure 7 : La photopériode régule l'activité sexuelle chez le hamster syrien via la mélatonine.**

L'activité sexuelle des animaux est suivie en mesurant le poids des testicules chez les mâles. Lorsque les animaux sont en photopériode longue, ils sont sexuellement actifs. 8 à 10 semaines après leur transfert en photopériode courte, ils deviennent sexuellement inactifs (les gonades régressent). La pinéalectomie empêche cette régression en photopériode courte, impliquant directement la mélatonine dans ce mécanisme. PC : photopériode courte ; PL : photopériode longue. (d'après *Revel, 2007*)

### a) Mélatonine et reproduction

La mélatonine est directement impliquée dans le contrôle de l'axe reproducteur, puisqu'une pinéalectomie inhibe l'atrophie des gonades en photopériode courte chez des hamsters syriens (**figure 7**, Pévet, 1988). La durée du pic nocturne de mélatonine étant corrélée à la durée de la nuit chez toutes les espèces étudiées (Simonneaux & Ribelayga, 2003 pour revue), la durée de ce signal semble donc être le paramètre le plus important pour le codage de l'information photopériodique (**figure 8**). Des injections ou infusions de mélatonine exogène d'une durée équivalente à un signal de type photopériode courte à des hamsters syriens pinéalectomisés et placés en photopériode longue miment l'effet de la photopériode courte sur l'axe reproducteur, alors que celles dont la durée correspond à un signal de type photopériode longue n'ont aucun effet (Bartness *et al.*, 1993 pour revue). De même, des injections en fin de jour chez des animaux en photopériode longue non pinéalectomisés, donc prolongeant la durée de présence de la mélatonine endogène, permettent l'apparition d'une physiologie de type photopériode courte (Reiter, 1987; Tamarkin *et al.*, 1977; Tamarkin *et al.*,

1976). Cependant, des injections réalisées en début de jour n'ont pas d'effet, ce qui amène une autre hypothèse : l'existence d'une fenêtre de sensibilité à la mélatonine, ou hypothèse de coïncidence (**figure 8**). Chez des hamsters syriens pinéalectomisés en photopériode longue ou courte, l'administration de deux pics consécutifs de mélatonine exogène de 2h30 et séparés de 3h (correspondant à un signal de type photopériode courte) permet l'apparition d'une physiologie de type photopériode courte. Cependant, ce n'est pas le cas lorsque les deux pics sont séparés de 5h30, montrant bien que la présence de mélatonine à un certain moment du cycle LD est importante dans la mise en place de la réponse (Pitrosky *et al.*, 1995; Pitrosky & Pévet, 1997). De plus, cette réponse est possible lorsque les deux pics sont administrés de jour avec le même écart, alors que l'administration du deuxième pic seulement durant la période de sensibilité nocturne supposée n'a aucun effet. Ceci suggère donc que c'est le début du pic de mélatonine qui dirige cette période de sensibilité. Au-delà de ces deux hypothèses, une troisième peut également être prise en compte, quoique non prouvée expérimentalement : l'amplitude du pic de mélatonine. En effet, chez de nombreuses espèces, le pic de mélatonine présente une amplitude plus importante en photopériode courte qu'en photopériode longue (voir **figure 8**, Simonneaux & Ribelayga, 2003 pour revue).



**Figure 8 : Représentation schématique des différentes hypothèses du mode d'action de la mélatonine sur le contrôle des fonctions saisonnières.** d: durée ; a: amplitude ; les barres noires et blanches représentent respectivement la nuit et le jour. (d'après Simonneaux & Ribelayga, 2003)

Bien que les effets de la mélatonine sur la physiologie saisonnière soient aujourd'hui clairement établis chez de nombreuses espèces (Malpaux *et al.*, 2001; Pévet, 1988; Pévet, 2003 pour revues), les cibles de cette hormone ne sont pas encore clairement identifiées. Elle agirait préférentiellement sur différentes cibles hypothalamiques en fonction de l'espèce : les NSC chez le hamster sibérien et l'hypothalamus médiobasal chez le hamster syrien et le mouton (Bartness *et al.*, 1993; Malpaux *et al.*, 2001; Malpaux *et al.*, 1999).

Les mécanismes d'action de cette hormone restent également encore incompris, même s'il est clairement établi que la mélatonine agit sur la sécrétion de GnRH (Malpaux *et al.*, 2001). Très récemment, un lien entre la mélatonine et la GnRH a été montré *via* la régulation du gène *KISS-1* codant pour les kisspeptines, des peptides stimulateurs de l'axe gonadotrope et exprimés différemment selon la photopériode (Revel *et al.*, 2007 pour revue). L'expression de *KISS-1* est diminuée en photopériode courte, et une pinéalectomie prévient cette diminution, confirmant donc l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'expression de ce gène (Revel *et al.*, 2006a). De plus, l'administration de kisspeptine à des hamsters syriens en photopériode courte permet de réinduire la croissance testiculaire. La mélatonine régule également l'expression d'autres gènes au sein de l'hypothalamus médiobasal comme par exemple *Dio2*, codant une enzyme permettant la conversion de la prohormone T4 en sa forme active T3 et impliquée dans le contrôle de la reproduction (Revel *et al.*, 2006b; Watanabe *et al.*, 2004), ou encore les gènes de la famille des RF-Amides également régulés par la photopériode (Revel *et al.*, 2008). La mélatonine pourrait donc agir *via* des cibles multiples dont le but est le contrôle direct ou indirect de la fonction de reproduction, toutes ces cibles agissant de façon isolée ou en synergie.

### b) Mélatonine et prolactine

La prolactine est une hormone synthétisée par la *pars distalis* de l'hypophyse et impliquée dans les variations photopériodiques de la couleur du pelage et de la lactation. Elle présente un profil de sécrétion photopériodique avec un maximum en photopériode longue, que les animaux soient de jours courts ou de jours longs (Lincoln *et al.*, 2003a; Lincoln *et al.*, 2003b). Cependant, la *pars distalis* ne possède pas de récepteurs à la mélatonine et ne serait donc pas une cible directe de cette hormone. En revanche, la PT, située à proximité, en possède de nombreux et pourrait être le site d'action de la mélatonine. En effet, des expériences de co-cultures montrent que les cellules de la PT ne sécrètent pas de prolactine, mais stimulent sa libération par les cellules de la *pars distalis* (Hazlerigg *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1996).

La mélatonine agit sur la PT *via* le contrôle des gènes horloge, notamment *per1*, *cry1* et *rev-erba* (Dardente, 2007 pour revue). L'expression de ces gènes est rythmique dans la PT, avec un pic de *per1* en début de jour et un pic de *cry1* en début de nuit. Elle varie avec la photopériode, les effets étant différents selon les espèces : le pic de *per1* reste toujours centré sur le début du jour, avec des niveaux plus faibles en photopériode courte chez le hamster syrien et le mouton (Lincoln *et al.*, 2002; Messenger *et al.*, 1999), alors qu'il devient arythmique chez le hamster sibérien (Johnston *et al.*, 2005; Messenger *et al.*, 2000). Le rythme d'expression de *per1* chez des souris mutantes pour les récepteurs *Mt1* est aboli (Stehle *et al.*, 2002; von Gall *et al.*, 2002a). De plus, une injection de mélatonine en fin de nuit chez le hamster syrien inhibe le pic de *per1* en début de jour (Messenger *et al.*, 1999), suggérant un effet inhibiteur de la mélatonine sur l'expression de *per1*. A l'inverse, l'expression de *cry1* chez le rat est induite en début de nuit par une injection de mélatonine (Dardente *et al.*, 2003).

L'hypothèse la plus courante sur le contrôle de la sécrétion saisonnière de prolactine est que la mélatonine, *via* son profil rythmique photopériodique, permet de centrer l'expression de *per1* et *cry1* respectivement sur le début de jour et de nuit. Ce sont ensuite les différences de phase entre l'expression de ces deux gènes en fonction de la photopériode qui permettraient le contrôle saisonnier de la synthèse et de la libération de prolactine par la *pars distalis* (Dardente, 2007 pour revue). Cependant, le lien existant réellement entre l'expression des gènes horloge dans la PT et la libération de prolactine reste encore à établir.

#### 4. Effet de la mélatonine sur l'horloge circadienne

En plus de ces effets dans la régulation des rythmes saisonniers, la mélatonine joue également un rôle dans l'entraînement de l'horloge circadienne (Pévet, 2003). En effet, une infusion journalière de mélatonine exogène, à des doses pharmacologiques, entraîne le rythme d'activité locomotrice à 24 heures chez le rat et le hamster lorsque les animaux sont placés en DD (Pitrosky *et al.*, 1999; Schuhler *et al.*, 2002; Slotten *et al.*, 1999). Cet effet n'est visible que lorsque l'administration de mélatonine coïncide avec le début de l'activité locomotrice endogène (CT12). Des effets similaires ont été obtenus *in vitro* : la mélatonine cause une avance de phase de l'activité électrique des NSC et inhibe la fréquence de décharge ainsi que l'excitabilité des neurones des NSC, avec un effet plus important à la transition jour subjectif/nuit subjective (von Gall *et al.*, 2002b). Cependant, cet effet sur la synchronisation de l'horloge a lieu à un moment où la mélatonine endogène n'est pas présente et n'est possible qu'avec des doses pharmacologiques. De plus, une pinéalectomie, supprimant le rythme de

mélatonine endogène, n'a pas d'effet sur le rythme d'activité locomotrice (Cheung & McCormack, 1982). Néanmoins, des souris ne produisant pas de mélatonine (souche C3H) montrent une amplitude des réponses à un créneau lumineux plus importante que des souris en produisant (von Gall *et al.*, 1998), et une pinéalectomie induit une diminution de la fréquence de décharge des neurones des NSC (Rusak & Yu, 1993), supposant tout de même un rôle pour la mélatonine endogène.

L'action de la mélatonine sur la synchronisation des NSC passe essentiellement par les récepteurs MT2, alors que les MT1 seraient responsables de l'inhibition de l'activité électrique (Jin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1997a). Cependant, chez le hamster sibérien qui ne possède pas de récepteur MT2, les décalages de phase induits par la mélatonine sont toujours visibles (Weaver *et al.*, 1996), suggérant certainement une redondance des deux récepteurs chez certaines espèces. D'un point de vue moléculaire, l'application de mélatonine sur les NSC n'affecte que l'expression rythmique de *Rev-erba* avec une avance de phase immédiatement suite à l'application de mélatonine à la transition jour subjectif/nuit subjective (Agez *et al.*, 2007), l'expression des autres gènes horloge montrant un décalage de phase la deuxième nuit suivant l'application (Poirel *et al.*, 2003).

### **E. Conclusion : l'horloge et la mélatonine délivrent une information temporelle à l'organisme**

L'adaptation des organismes aux changements annuels des conditions environnementales, notamment la durée du jour et de la nuit, est assurée par un système de lecture du temps permettant l'anticipation de ces variations. Parmi toutes les structures intervenant dans cette adaptation, l'horloge et la glande pinéale constituent un couple important dans la distribution de l'information journalière et saisonnière à l'organisme. L'information photopériodique codée et transmise par l'horloge est traduite dans la glande pinéale en une sécrétion rythmique nocturne de mélatonine, dont la durée varie proportionnellement à la durée de la nuit. Grâce à cette dynamique de synthèse et de libération, la mélatonine assure un rôle de messenger endocrine nécessaire à l'adaptation de certaines fonctions physiologiques à la photopériode ambiante (par exemple la reproduction).

Afin de comprendre comment la synthèse de mélatonine est restreinte à la période nocturne du nyctémère, il apparaît important de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant cette synthèse dans la glande pinéale.

## **II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères**

La majorité des recherches sur l'anatomie, l'histologie, l'embryologie et l'innervation de la glande pinéale ont débuté à la fin du XIXe siècle. C'est ainsi que sa ressemblance avec l'organe épiphysaire fut évoquée, ainsi que son origine phylogénétique : elle dérive de l'organe photorécepteur. C'est suite à la découverte du lien existant entre le cycle LD et la synthèse de mélatonine, et surtout de son rôle physiologique, que les chercheurs se sont intéressés à la caractérisation des mécanismes régulant cette synthèse, du contrôle par l'horloge aux événements moléculaires internes à la glande pinéale. Aujourd'hui, il reste encore de nombreux aspects à éclaircir concernant ces mécanismes, notamment en termes de différences inter-spécifiques dans le profil du rythme (amplitude, durée, etc).

L'objectif de cette partie est d'expliquer le fonctionnement cellulaire régulant la synthèse de mélatonine chez les mammifères, de l'innervation de la glande pinéale à la genèse du rythme de mélatonine, en passant par les voies de signalisations impliquées. Pour cela, les données présentées se focaliseront sur les études réalisées chez le rat, le modèle le plus couramment utilisé.

### **A. La glande pinéale, une structure neuroendocrine sous influence**

#### **1. Morphologie et types cellulaires**

La glande pinéale est une structure neuroendocrine provenant d'une évagination du toit du diencephale. Chez les mammifères, elle forme une structure impaire et compacte, de forme pyramidale, située entre les commissures habénulaire et postérieure, à l'exception des rongeurs où elle migre en position dorsale. Chez ceux-ci la glande pinéale est divisée en trois parties : la glande pinéale superficielle située entre les hémisphères cérébraux et le cervelet, la glande pinéale profonde qui constitue le point d'attache de la glande à proximité du 3<sup>ème</sup> ventricule, et la tige épiphysaire faisant le lien entre les deux parties (Møller & Baeres, 2002). Cette glande possède une vascularisation riche qui permet une diffusion rapide des produits de sécrétion. Les vaisseaux sanguins sont entourés d'un espace périvasculaire s'invaginant dans le parenchyme, permettant d'augmenter la surface de diffusion. Cet espace semble avoir un rôle

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

fonctionnel important, puisque la majorité des terminaisons nerveuses et des prolongements des pinéaloctes terminent à ce niveau (Karasek & Reiter, 1992). Il est également possible que les produits de sécrétion, dont la mélatonine, soient directement libérés dans le 3<sup>ème</sup> ventricule. En effet, chez le mouton, les concentrations en mélatonine sont très importantes dans celui-ci, avec des niveaux plus élevés de nuit (Malpaux *et al.*, 2001; Tricoire *et al.*, 2002; Tricoire *et al.*, 2003), et chez les rongeurs, la glande pinéale profonde possède des pinéaloctes fonctionnels exprimant toute la machinerie nécessaire à la synthèse de mélatonine (Garidou *et al.*, 2001; Ribelayga *et al.*, 1998a).

La glande pinéale est constituée majoritairement de pinéaloctes (90%), des cellules dérivant des photorécepteurs. Chez les poissons, les amphibiens et les reptiles ces cellules sont très semblables aux cônes de la rétine et convertissent l'information lumineuse en influx nerveux (Falcón, 1999 pour revue). Cependant, chez les mammifères, ils ont perdu cette capacité et se sont spécialisés en cellules neuroendocrines. La glande pinéale contient également des cellules gliales (environ 10%, mais la proportion varie en fonction des espèces), majoritairement des astrocytes, quelques rares neurones dont la fonction reste encore inconnue (Karasek & Reiter, 1992), et quelques cellules phagocytaires (Møller *et al.*, 2006).

### 2. Afférences nerveuses

L'innervation majeure de la glande pinéale est constituée par la voie hypothalamo-pinéale (voir **section I.D.**). Bien que cette voie soit la principale contrôlant la synthèse rythmique de mélatonine, d'autres afférences centrales et périphériques semblent intervenir. La destruction des fibres sympathiques provenant des GCS par une ganglionectomie ne détruit pas toutes les fibres nerveuses innervant la glande pinéale, puisque des fibres NAergiques et NPYergiques innervant la partie profonde de la glande pinéale persistent (Møller *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1991), impliquant donc l'existence de fibres extra-sympathiques. Ces afférences sont toutefois moins denses que l'innervation provenant des GCS. Il existe ainsi diverses connections neuropeptidergiques entre la glande pinéale et certaines structures centrales : AVP et ocytocine en provenance des NPV (Buijs & Pévet, 1980; Larsen *et al.*, 1991), NPY en provenance des FIG (Mikkelsen & Møller, 1990; Møller *et al.*, 1990), substance P en provenance des noyaux habénulaires (Ronnekleiv & Kelly, 1984). Il existe d'autres fibres en provenance des NR dorsal (5-HT ; Leander *et al.*, 1998), de l'hypothalamus latéral (hypocrétine ; Fink-Jensen & Møller, 1990; Mikkelsen *et al.*, 2001) et de l'hypothalamus postérieur (histamine ; Mikkelsen *et al.*, 1992).

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

La glande pinéale est également innervée par des fibres parasympathiques en provenance des ganglions pterygopalatins (sphéno-palatins chez les rongeurs) et otiques (Larsen *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1991; Møller & Liu, 1999; Shiotani *et al.*, 1986), contenant du VIP et de l'Ach (Shiotani *et al.*, 1986). Il existe également une innervation provenant du ganglion trigéminal et contenant essentiellement de la substance P, du CGRP et du PACAP (Møller & Liu, 1999; Reuss, 1999; Shiotani *et al.*, 1986).

La glande pinéale reçoit des afférences diverses, toutes pouvant potentiellement moduler la synthèse de mélatonine (Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revue).

### 3. Influences endocrines

La glande pinéale, située à l'extérieur de la barrière hémato-encéphalique, peut également être la cible de nombreuses hormones (Møller & Baeres, 2002). Des sites de liaison nucléaires à l'oestradiol, la testostérone et la progestérone ont été décrits chez le rat (Cardinali *et al.*, 1983; Vacas *et al.*, 1979). D'une manière générale, la testostérone stimule (Hernandez *et al.*, 1990) et les oestrogènes inhibent la synthèse de mélatonine en agissant sur l'activité de ses enzymes de synthèse (Hayashi & Okatani, 1999; Hernández-Díaz *et al.*, 2001). Leur action se ferait également par une modification de la libération de NA ou une modification de la densité des récepteurs adrénergiques (Alonso *et al.*, 1995; Hernandez *et al.*, 1990; Yie & Brown, 1995). Cependant, l'effets des stéroïdes sexuels sur la synthèse de mélatonine en conditions physiologiques, par exemple au cours du cycle oestrien chez la ratte, restent controversées (Johnson *et al.*, 1982; Ozaki *et al.*, 1978; Rollag *et al.*, 1979; Skorupa *et al.*, 2003).

Les glucocorticoïdes pourraient également moduler la synthèse de mélatonine. Chez le rat, le poulet et la truite, ils inhibent l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine induite par la NA *in vivo* et *in vitro* (Benyassi *et al.*, 2001; Zawilska & Sadowska, 2002; Zhao & Touitou, 1993). Cependant, l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale de rat sont potentialisées dans des glandes en culture préalablement pré-incubées 48h avec de la corticostérone (Ferreira *et al.*, 2005). Les effets des glucocorticoïdes ne sont pas encore très clairs, mais ils pourraient moduler le métabolisme de la glande pinéale lors de situations de stress, de réaction d'inflammation ou encore durant le développement.

### 4. Influences autocrines/paracrines

La glande pinéale est également sous l'influence de facteurs autocrines. En premier lieu, la mélatonine exogène peut modifier certains paramètres physiques et biochimiques internes à

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

la glande comme l'activité de ses enzymes de synthèse (Freire & Cardinali, 1975), la libération de la NA (Chuluyan *et al.*, 1991) ou encore la libération de 5-HT (Míguez *et al.*, 1995). La 5-HT est un précurseur de la mélatonine stocké dans des vésicules cytoplasmiques (Hayashi *et al.*, 1999), avec une concentration plus importante de jour que de nuit. Elle est sécrétée par les pinéaloctes avec un maximum en début de nuit (Míguez *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2002). Elle ne stimule pas directement, mais potentialise la sécrétion de mélatonine induite par la NA (Míguez *et al.*, 1997; Sugden, 1990a). Elle permettrait d'augmenter la synthèse de mélatonine en début de nuit lorsque la libération de NA est encore modérée.

La glande pinéale synthétise et libère également du glutamate et du GABA. Le glutamate est présent en grandes concentrations dans les pinéaloctes et les cellules gliales et est libéré suite à une dépolarisation de la membrane plasmique induite par l'action de l'acétylcholine sur les récepteurs nicotiques (Letz *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1998a). Il inhibe l'accumulation d'AMPc induite par la NA et par conséquent la synthèse de mélatonine (Yamada *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1998b). De plus, le glutamate peut réguler la libération présynaptique de NA (Wang *et al.*, 1992). Le GABA est également synthétisé et libéré dans la glande pinéale où il inhibe la synthèse de mélatonine via les récepteurs GABA<sub>A</sub> et la libération de NA via les récepteurs GABA<sub>B</sub> (Rosenstein *et al.*, 1990; Rosenstein *et al.*, 1989).

### B. La voie de biosynthèse

La première étape de la biosynthèse de la mélatonine est la capture du Tryptophane par les pinéaloctes à partir de la circulation sanguine. Le Tryptophane est le précurseur de cinq voies métaboliques aboutissant à la synthèse de 5-methoxyindoles (**figure 9**), dont le plus important physiologiquement est la mélatonine. Cette biosynthèse fait intervenir différentes étapes : une hydroxylation du Tryptophane en 5-hydroxytryptophane par la Tryptophane Hydroxylase (TpOH, EC 1.14.16.4), suivie d'une décarboxylation du 5-hydroxytryptophane en 5-hydroxytryptamine ou sérotonine (5-HT) par une Décarboxylase des Acides Aminés Aromatiques (DAAA, EC A.1.1.28), puis une acétylation de la 5-HT en N-acétyl-sérotonine par l'Arylalkylamine-N-acétyltransférase (AA-NAT, EC 2.3.1.37), et enfin une O-méthylation de la N-acétyl-sérotonine en N-acétyl-5-methoxytryptamine ou mélatonine par l'Hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT, EC 2.1.1.4) (Klein *et al.*, 1981a, pour revue). Chacune de ces enzymes possède des propriétés biochimiques et une régulation propre les rendant plus ou moins importantes dans le rythme de synthèse de la mélatonine.

### **1. Du Tryptophane à la 5-HT : TpOH et DAAA**

L'activité de la TpOH dans la glande pinéale est très élevée et fait de celle-ci la deuxième structure cérébrale contenant le plus de 5-HT (Lovenberg *et al.*, 1967). Cette enzyme mitochondriale catalyse la formation de 5-hydroxytryptophane (5-HTP) à partir de Tryptophane (Trp) et de tétrahydrobioptérine (Deguchi & Barchas, 1972).

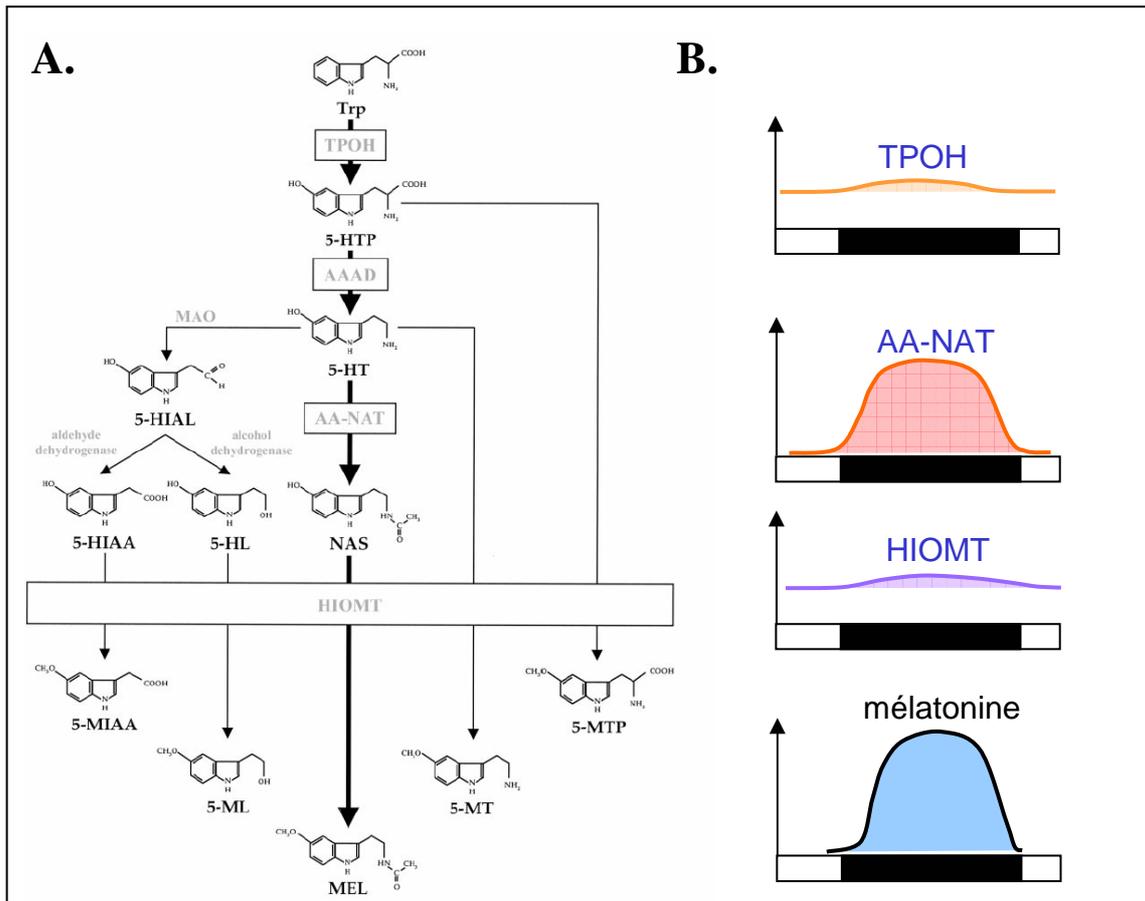
Les ARNm de la *TpOH* sont exprimés avec un fort niveau de base durant le jour chez le rat, et ils augmentent d'environ 20% durant la nuit (Besançon *et al.*, 1996). La protéine TpOH a une taille d'environ 51 kiloDalton (kD) et une demi-vie de 75 minutes (Sitaram & Lees, 1978). Dans la glande pinéale de rat, l'activité de la TpOH est élevée durant le jour et est encore doublée durant la nuit (**figure 9**, Ehret *et al.*, 1991). Ce rythme dépend l'horloge endogène car il persiste en DD et disparaît en LL, condition où la libération endogène de NA est inhibée. La NA augmente l'activité de la TpOH *via* la phosphorylation de la protéine par la PKA (Ehret *et al.*, 1991). Cependant, d'autres sites de phosphorylation par la Ca/CaMK de type II pourraient réguler l'activité de la TpOH en promouvant sa fixation à la protéine chaperonne 14-3-3 (Ehret *et al.*, 1989; Furukawa *et al.*, 1993; Yamauchi & Fujisawa, 1979), bien que cela n'ait pas encore été démontré dans la glande pinéale.

Le 5-hydroxytryptophane synthétisé par la TpOH est décarboxylé en 5-HT par la DAAA, une enzyme cytosolique ubiquitaire dont l'activité, indépendante de la stimulation noradrénergique, ne présente pas de variations journalières (Chan & Ebadi, 1981). Cependant, son activité est augmentée en LL ou après une ganglionectomie (Snyder *et al.*, 1964; Snyder *et al.*, 1965), suggérant une régulation à long terme de l'enzyme.

### **2. De la 5-HT à la N-acétyl-sérotinine : AA-NAT**

L'AA-NAT catalyse la formation de N-acétyl-sérotinine (NAS) à partir de 5-HT et d'acétyl coenzyme A (AcCoA; Klein *et al.*, 1981a, pour revue). Elle est exprimée à des niveaux élevés dans la glande pinéale et les photorécepteurs de la rétine, et à des niveaux très faibles dans d'autres structures cérébrales (PT, hippocampe, cervelet, NSC) et périphérique (testicules, glande de Harder, intestins) (Borjigin *et al.*, 1995; Coon *et al.*, 1996; Djeridane *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 1997; Uz *et al.*, 2002). Cette enzyme est très proche de l'Arylamine N-acétyltransférase catalysant également l'acétylation des amines aromatiques. Cependant, bien que les deux enzymes soient exprimées dans la glande pinéale, seule l'AA-NAT intervient dans la synthèse de mélatonine du fait de la très grande affinité de la 5-HT pour cette dernière (Voisin *et al.*, 1984).

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 9 : Voie métabolique de biosynthèse des indole-amines dans la glande pinéale.** (A) La voie métabolique de biosynthèse de la mélatonine est la plus importante (flèches en gras) et fait intervenir 4 enzymes: la TpOH, la DAAA, l'AA-NAT et l'HIOMT. L'HIOMT est particulièrement importante dans la formation de tous les méthoxy-indoles. (B) Représentation schématique des variations nocturnes de l'activité de la TpOH, l'AA-NAT, l'HIOMT ainsi que de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale de rat. Tandis que l'activité de la TpOH et de l'HIOMT ne varie presque pas, l'AA-NAT subit de fortes modifications de son activité exactement en phase avec le rythme de mélatonine. Ce profil particulier fait de l'AA-NAT l'enzyme limitante de la synthèse de mélatonine. (d'après *Simonneaux & Ribelayga, 2003*)

Le gène *Aa-nat* présente une très grande homologie de séquence entre les différentes espèces chez lesquelles il a été cloné (*Klein et al., 1997, pour revue*). Trois gènes sont présents chez les poissons : l'*Aa-nat1a* et *1b* majoritairement exprimés dans la rétine, et l'*Aa-nat2* majoritairement exprimé dans la pinéale (*Appelbaum et al., 2004; Benyassi et al., 2000; Coon & Klein, 2006; Falcón et al., 2003; Vuilleumier et al., 2007*). En revanche, chez les mammifères et les oiseaux, un seul gène est présent, composé de 3 introns et de 4 exons, et codant un ARNm dont la taille varie entre 1 et 1,7 kb. Chez les mammifères, la régulation de

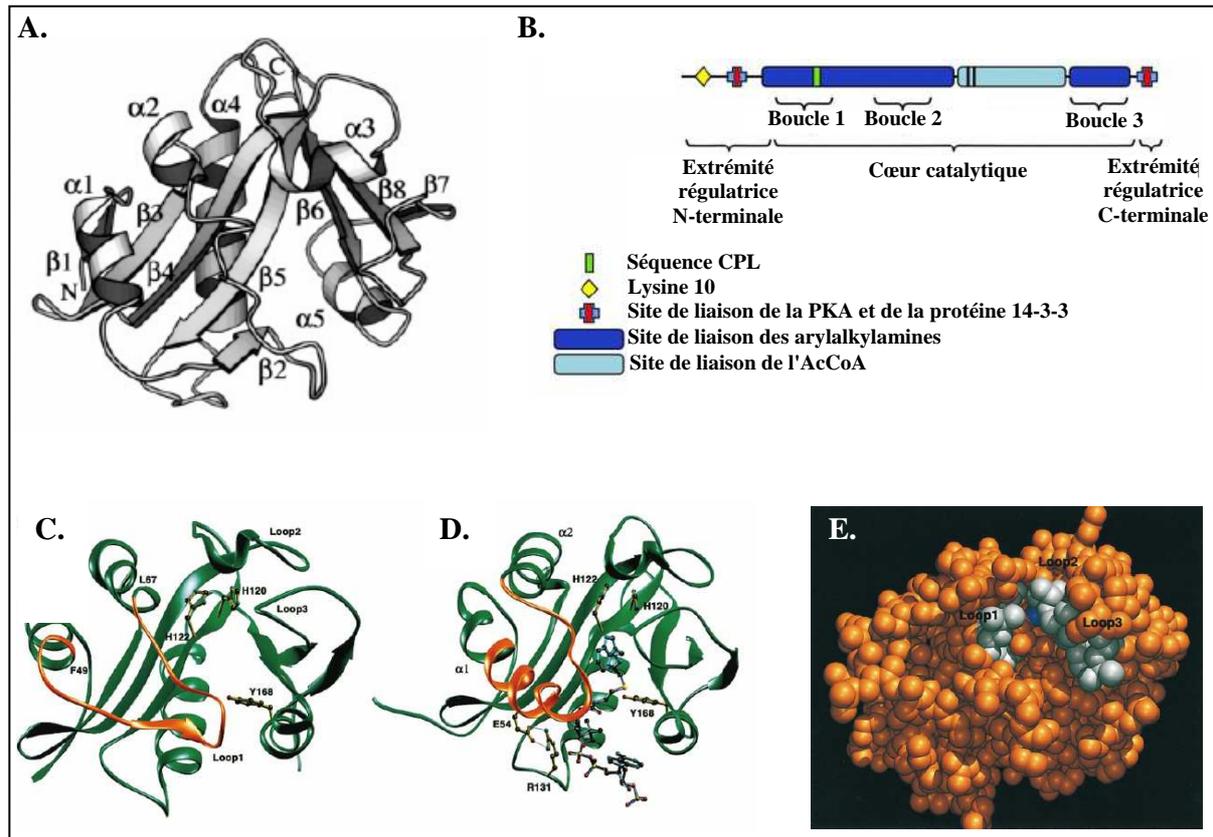
## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

l'expression de l'*Aa-nat* dépend de l'espèce. Chez tous les rongeurs étudiés, les niveaux d'ARNm sont indétectables de jour et augmentent très largement de nuit (100 à 150 fois), alors que chez les ongulés et les primates, les niveaux sont déjà élevés de jour et n'augmentent pas ou très peu de nuit (Klein *et al.*, 1997; Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revues). Ces variations dépendent de l'horloge des NSC car elles persistent en DD et sont abolies en LL.

La protéine AA-NAT est très instable (demi-vie entre 3 et 5 minutes). Son activité est très faible de jour et augmente durant la nuit d'environ 10 fois chez le mouton et l'homme, et de 50 à 70 fois chez les rongeurs (Klein *et al.*, 1997; Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revues). Les mécanismes permettant cette augmentation diffèrent selon l'espèce considérée, mais elle est dans tous les cas directement contrôlée par l'horloge *via* la voie hypothalamo-pinéale car le rythme persiste en DD et est aboli en LL ou suite à une lésion des NSC (Klein & Moore, 1979; Moore & Klein, 1974). Chez toutes les espèces étudiées, le rythme endogène de synthèse de la mélatonine suit parfaitement le rythme d'activité de l'AA-NAT (**figure 9**), faisant de cette dernière **l'enzyme limitante dans l'initiation et l'arrêt de la synthèse de mélatonine**. De ce fait, la plupart des études visant à étudier la régulation de la synthèse de mélatonine se sont focalisées sur la régulation de la synthèse et de l'activité de cette enzyme "donneuse de temps".

L'AA-NAT est une protéine cytosolique globulaire de 23 kD composée de 8 feuillets  $\beta$  et de 5 hélices  $\alpha$  chez le rat (**figure 10A**, Hickman *et al.*, 1999a; Hickman *et al.*, 1999b). La plus grande partie de la structure compose le "cœur" catalytique, avec un domaine de liaison à l'AcCoA et un domaine de liaison aux arylalkylamines divisé en deux parties (**figure 10B**, Klein, 2007). Dans sa conformation tridimensionnelle, le site catalytique forme une cuvette, le site de liaison à l'AcCoA étant situé au fond de celle-ci. Trois boucles, formées par des résidus situés entre les hélices  $\alpha 1$  et 2, entre les feuillets  $\beta 4$  et 5 et entre les feuillets  $\beta 7$  et 8, appartenant au site de liaison des arylalkylamines forment les bords de cette cuvette, et permettent la formation d'une région hydrophobe (Hickman *et al.*, 1999a; Hickman *et al.*, 1999b). Les boucles 2 et 3 sont rigides, tandis que la boucle 1 est mobile et s'étend à l'intérieur du site catalytique lorsque l'enzyme est inactive (**figure 10C**, Hickman *et al.*, 1999b). Lors de la fixation de l'AcCoA, la boucle 1 se retire, ce qui change la conformation de la protéine et libère l'accès au site de liaison aux arylalkylamines (**figure 10D et E**; Angelis *et al.*, 1998; Hickman *et al.*, 1999b). La mobilité de cette boucle est due à la présence d'une séquence de trois acides aminés, très conservée chez les vertébrés, qui permet également d'améliorer les capacités catalytiques de l'enzyme (Pavlicek *et al.*, 2008). Lorsque la 5-HT est acétylée, la N-acétyl-sérotonine est relarguée et le CoA diffuse librement hors du site catalytique.

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 10 : Structure de la protéine AA-NAT.** (A) Structure tridimensionnelle de l'AA-NAT ovine (acides aminés 28-201). La partie centrale est composée de 8 feuillets  $\beta$  entourés de 5 hélices  $\alpha$ . (B) Représentation simplifiée de l'AA-NAT et des sites de régulation. Le site de liaison aux arylalkylamines est composé de 3 boucles situées de part et d'autre du domaine de liaison à l'AcCoA. Les extrémités C- et N-terminales contiennent des sites de liaison de la PKA et de la protéine 14-3-3, importants dans la stabilité de la protéine. La séquence Cphotopériode longue permet d'assurer la mobilité de la boucle 1 (Loop1). (C, D et E) Structure tridimensionnelle de la protéine AA-NAT ovine révélant la position des 3 boucles formant le site de liaison aux arylalkylamines. Le site catalytique forme une poche dans laquelle s'invagine la boucle 1 (en rouge) lorsque la protéine est au repos (C). Lorsque l'AcCoA se fixe (D), la boucle 1 se déplace, libérant le site de liaison des arylalkylamines (molécule bleue). (d'après *Hickman et al., 1999a, b*)

La protéine AA-NAT possède plusieurs sites de régulation aux extrémités N- et C-terminales : deux sites de phosphorylation pour la PKA, deux sites de liaison à la protéine 14-3-3, ainsi qu'une lysine en position 10, importants dans la régulation de la dégradation de la protéine par les protéasomes (**figure 10B**, *Ganguly et al., 2002; Klein, 2007; Klein et al., 1997*, pour revues). Des sites de phosphorylation pour la PKC et la Caséine Kinase de type II ont également été décrits.

### **3. De la N-acétyl-sérotinine à la mélatonine : HIOMT**

L'HIOMT est la dernière enzyme intervenant dans la synthèse de la mélatonine. Cette protéine cytosolique catalyse la méthylation de la N-acétyl-sérotinine en mélatonine à partir du cofacteur S-adénosyl-méthionine (Klein *et al.*, 1981c, pour revue). La S-adénosyl-méthionine est présente rythmiquement dans la glande pinéale, avec une forte diminution durant la nuit accompagnée d'une augmentation de 2,5 fois de l'activité enzymatique de la méthionine-adénosyltransférase (Kim *et al.*, 2005a; Sitaram *et al.*, 1995). L'HIOMT catalyse préférentiellement la formation de mélatonine, mais également la synthèse des autres méthoxyindoles dans la glande pinéale (**figure 9**, Klein *et al.*, 1981c; Simonneaux & Ribelayga, 2003). Son expression est restreinte aux seuls organes synthétisant la mélatonine avec de fortes concentrations dans la glande pinéale, et de très faibles quantités dans la rétine, la glande de Harder et les intestins (Cardinali & Rosner, 1971; Cardinali & Wurtman, 1972; Pévet *et al.*, 1980).

Le gène *Hiomt* code un ARNm de 1,7 kb chez le rat, dont la région codante fait 1,1 kb (Gauer & Craft, 1996). La séquence est peu conservée, avec seulement 50 à 70% d'homologie entre les espèces chez lesquelles il a été cloné. Chez le rat, l'ARNm de l'*Hiomt* est exprimé selon un rythme circadien dépendant de l'horloge et de la NA, avec des quantités élevées durant le jour et doublées durant la nuit (Gauer & Craft, 1996; Ribelayga *et al.*, 1999a; Ribelayga *et al.*, 1999b).

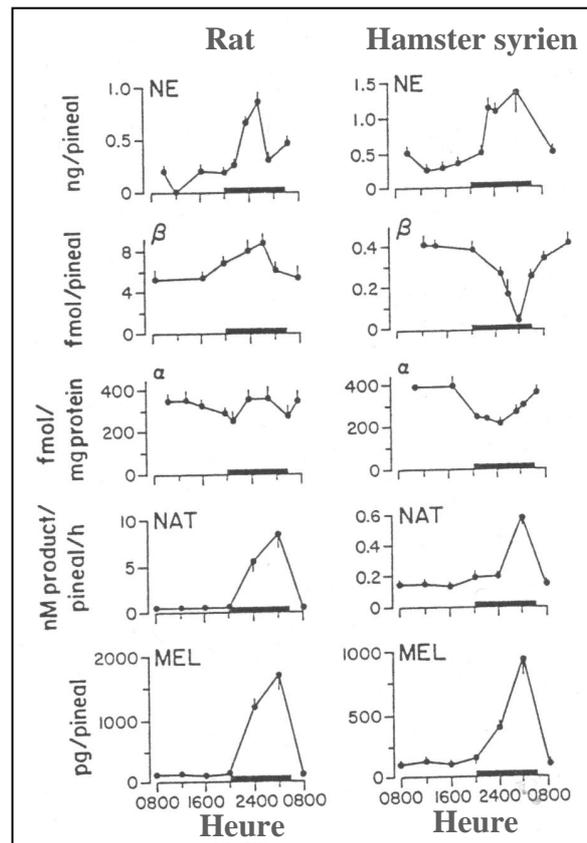
La protéine HIOMT a une taille d'environ 78 kD et s'organise en dimères de deux sous-unités équivalentes de 39 kD. Cependant, la structure même de la protéine possède une grande hétérogénéité entre les différentes espèces étudiées (Nakane *et al.*, 1983). L'HIOMT est une protéine très stable dont la demi-vie est supérieure à 24 heures (Bernard *et al.*, 1995; Bernard *et al.*, 1996; Sugden *et al.*, 1987a). Son activité est élevée durant le jour et ne varie pas ou très peu sur 24 heures (**figure 9**) : une augmentation de 40 à 50% durant la nuit a été décrite chez le rat (Ribelayga *et al.*, 1999a; Ribelayga *et al.*, 1997) et aucune variation chez le mouton, l'homme ou le singe (Bernard *et al.*, 1995; Coon *et al.*, 2002). L'augmentation observée chez le rat est maintenue en DD et inhibée en LL, suggérant un contrôle par l'horloge endogène (Ribelayga *et al.*, 1999a). Les variations de l'activité seraient régulées au niveau post-traductionnel *via* la phosphorylation par la PKA, la PKC ou encore la Caséine Kinase de type II (Gauer & Craft, 1996). L'HIOMT n'est pas limitante dans la synthèse journalière de mélatonine, mais le serait pour les variations à long terme de l'amplitude du pic nocturne de mélatonine (voir **section II.E**).

### C. La voie de signalisation noradrénergique

La synthèse de mélatonine dans la glande pinéale est initiée par l'activation de ses enzymes de synthèse *via* différentes voies de signalisation contrôlées par différents neurotransmetteurs. Parmi toutes les afférences décrites, la plus dense et la plus importante dans la genèse du rythme de sécrétion de mélatonine est la voie hypothalamo-pinéale libérant la NA. Celle-ci assure un couplage étroit entre la synthèse de mélatonine et le cycle LD *via* les NSC. En effet, une ganglionectomie abolit le rythme d'expression de la synthèse de la mélatonine chez le rat (Deguchi & Axelrod, 1972a; Deguchi & Axelrod, 1972b; Moore & Klein, 1974). De plus, une stimulation électrique des GCS, provoquant une libération de NA, augmente l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine (Bowers & Zigmond, 1980). Ces résultats démontrent le rôle crucial de la NA dans la stimulation nocturne de la synthèse de mélatonine. De plus, la synthèse de NA dans les fibres sympathiques chez le rat et le hamster (Craft *et al.*, 1984) ou sa libération *in situ* dans la glande pinéale chez le rat (Drijfhout *et al.*, 1996a; Drijfhout *et al.*, 1996b) suit un rythme circadien évoluant en parallèle de celui de la synthèse de mélatonine (**figure 11**). Cependant, l'implication de la NA a réellement été prouvée grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes noradrénergiques. *In vivo*, l'injection d'agonistes noradrénergiques durant le jour augmente la synthèse de mélatonine chez le rat à des niveaux équivalents à ceux observés durant la nuit (Deguchi & Axelrod, 1972a; Klein *et al.*, 1983). Ces mêmes agonistes permettent également de stimuler l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine *in vitro* (Buda & Klein, 1978; Klein & Berg, 1970; Klein *et al.*, 1983; Simonneaux *et al.*, 1989). De même, l'application d'antagonistes noradrénergiques *in vivo* en début de nuit inhibe fortement le rythme de synthèse de mélatonine (Deguchi & Axelrod, 1972a; Klein *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1983). La NA est le neurotransmetteur majeur permettant aux NSC de réguler la synthèse rythmique de mélatonine dans la glande pinéale.

L'effet d'un neurotransmetteur sur un récepteur est primordial pour conduire les effets physiologiques associés. Cependant, le récepteur sur lequel il agit a également de l'importance, car un même neurotransmetteur peut agir sur plusieurs récepteurs et conduire ainsi des effets physiologiques différents. Dans ce cadre, l'action de la NA sur la glande pinéale est un exemple de choix, car responsable de la stimulation de la synthèse de mélatonine *via* l'action sur deux types de récepteurs : les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques. Ces deux récepteurs activent des voies de signalisations distinctes, chacune ayant un rôle différent et complémentaire dans la régulation de la synthèse de mélatonine.

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 11 : Variations journalières des récepteurs adrénergiques, de la NA, de l'AA-NAT et de la mélatonine dans la glande pinéale de rat et de hamster syrien.**  $\alpha$  : densité des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques;  $\beta$  : densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques; ; MEL: contenu en mélatonine; NE : synthèse de NA; NAT: activité de l'AA-NAT (d'après Pangerl, 1990).

### 1. La signalisation $\beta$ -adrénergique

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques constituent un maillon indispensable à la stimulation nocturne de la synthèse de mélatonine. Chez le rat, l'injection *in vivo* ou l'application *in vitro* sur des glandes pinéales d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique, l'isoprotérénol, permet de stimuler l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine à des niveaux équivalents aux valeurs nocturnes (Buda & Klein, 1978; Deguchi & Axelrod, 1972a; Deguchi & Axelrod, 1972b; Illnerová & Vanecek, 1983; Klein *et al.*, 1983). De plus, l'injection d'un antagoniste  $\beta$ -adrénergique, le propranolol, inhibe ces mêmes paramètres (Deguchi & Axelrod, 1972a; Klein *et al.*, 1983; Parfitt *et al.*, 1976). L'implication de ces récepteurs a été démontrée chez d'autres espèces de rongeurs (Garidou *et al.*, 2002a; Garidou *et al.*, 2003c; Reiter *et al.*, 1987a; Steinlechner *et al.*, 1984), chez le mouton (Chan & Ebadi, 1980; Morgan *et al.*, 1988), le bœuf (Rüppel & Olcese, 1991; Schomerus *et al.*, 2002) et l'homme (Cowen *et al.*, 1985).

### a) Expression des récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans la glande pinéale

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Trois sous-types composent cette famille : les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de type 1 fortement exprimés dans le cœur et le cerveau, les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de type 2 exprimés de façon plus large et les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de type 3 fortement exprimés dans le tissu adipeux. Ces 3 sous-types sont majoritairement couplés aux protéines Gas, qui stimulent l'Adénylate Cyclase (Hall, 2004 pour revue).

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de type 1 sont exprimés avec une forte densité sur la membrane des pinéaloctes de rat (Dickinson *et al.*, 1986; Zatz *et al.*, 1976). La densité de ces récepteurs, analysée par la liaison de ligands spécifiques radiomarqués, suit un rythme journalier et circadien chez le rat (**figure 11**, (Pangerl *et al.*, 1990, pour revue). Globalement, deux profils ont été décrits : l'un avec une densité maximale en fin de jour et minimale en milieu de nuit, et l'autre avec un maximum en milieu de nuit et un minimum durant le jour. La différence vient certainement du radioligand (tritié *versus* iodiné) et/ou des conditions lumineuses (LD 12:12 *versus* LD 14:10) utilisés (Pangerl *et al.*, 1990). Dans les deux cas, on observe une diminution de la densité en fin de nuit, au moment où l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine sont maximales. Un rythme de la densité de ces récepteurs a également été décrit chez le hamster syrien avec un maximum en fin de jour et un minimum en milieu de nuit, où les valeurs moyennes sont plus basses que chez le rat (**figure 11**, Pangerl *et al.*, 1990). Le rythme disparaît et la densité des récepteurs augmente lorsque les animaux sont placés en LL ou subissent une ganglionectomie (Craft *et al.*, 1985; Gonzalez-Brito *et al.*, 1988a; Gonzalez-Brito *et al.*, 1988b), suggérant un contrôle par l'horloge via la NA. L'ARNm des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est également exprimé avec un rythme journalier et circadien, avec des valeurs nocturnes doublées par rapport aux valeurs diurnes, ce rythme étant régulé par la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Carter, 1993c; Moller *et al.*, 1997; Pfeffer *et al.*, 1998).

### b) Conséquences de l'activation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

- **Stimulation de la production d'AMPC**

La stimulation noradrénergique de la glande pinéale (*in vivo* et *in vitro*) ou de pinéaloctes en culture induit une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPC (Deguchi & Axelrod, 1973; Klein & Berg, 1970; Strada *et al.*, 1972). Celle-ci dépend principalement de la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Deguchi, 1973; Klein *et al.*, 1983; Parfitt *et al.*, 1976; Zatz *et al.*, 1976) et implique une protéine Gs stimulant l'Adénylate

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

Cyclase (Minneman & Iversen, 1976a). L'activité de cette dernière suit un rythme journalier et circadien, avec un maximum durant la nuit/nuit subjective (Weiss, 1971). De même l'ARNm de l'Adénylate Cyclase de type 1 suit un rythme avec un maximum durant le jour et un minimum durant la nuit (Tzavara *et al.*, 1996). L'augmentation d'AMPc est rapide (5 à 15 minutes) et durable, avec une diminution progressive lorsque la stimulation est prolongée (Strada *et al.*, 1972). Cette diminution est due à des phosphodiesterases, clivant l'AMPc en AMP, et dont l'activité est maximale durant la nuit (Kim *et al.*, 2007; Minneman & Iversen, 1976b). Un mécanisme de désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par l'action de la NA peut également être responsable de cette diminution de sensibilité (Pangerl *et al.*, 1990).

L'augmentation d'AMPc est nécessaire et suffisante à la stimulation de la synthèse de mélatonine. En effet, le traitement de pinéaloctes dissociés ou de glandes pinéales en culture avec un analogue non-hydrolysable de l'AMPc, le dibutyryl-cAMP (dbcAMP), est suffisant pour stimuler l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine chez le rat (Berg & Klein, 1971; Klein *et al.*, 1970a; Klein *et al.*, 1970b; Romero *et al.*, 1975). La stimulation de la glande pinéale par de l'isoprotérénol, de la toxine cholérique ou du dbcAMP provoque une augmentation de l'activité d'une protéine kinase (Fontana & Lovenberg, 1971; Zatz & O'Dea, 1976), identifiée comme étant la PKA de type II (Maronde *et al.*, 1997b; Maronde *et al.*, 1999c; Schomerus *et al.*, 2002).

L'augmentation de l'AMPc et l'activation de la PKA entraînent d'autres événements cellulaires, tels la synthèse et l'activation de nombreux facteurs de transcription (voir **section III**), une hyperpolarisation de la membrane des pinéaloctes *via* l'activation de canaux potassiques, nécessaire à l'activation de l'AA-NAT (Ceña *et al.*, 1991; Parfitt *et al.*, 1975).

### • *Stimulation de la production de GMPc*

La stimulation noradrénergique de la glande pinéale induit également une production de GMPc chez le rat (Klein *et al.*, 1981b; O'Dea & Zatz, 1976). Celle-ci est dépendante de la stimulation  $\beta$ -adrénergique, car l'application d'isoprotérénol et non de phényléphrine (agoniste spécifique des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques) augmente le GMPc en culture, et l'application d'antagoniste  $\beta$ -adrénergique réduit cette augmentation (Klein *et al.*, 1981b; Sugden, 1990b; Vanecek *et al.*, 1985). Elle fait intervenir une Guanylate Cyclase membranaire, stimulée par une protéine Gs sensible à la toxine cholérique (Sugden & Klein, 1987).

D'un point de vue fonctionnel, l'augmentation de GMPc n'a pas d'influence directe sur la synthèse de mélatonine. Des analogues non-hydrolysables du GMPc administrés à des pinéaloctes en culture ont un faible effet sur la transcription de l'*Aa-nat*, mais aucun effet sur

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

son activité ou sur la synthèse de mélatonine (Lin *et al.*, 1994; Roseboom *et al.*, 1996; Seidel *et al.*, 1990; Spessert *et al.*, 1993). Cependant, d'autres rôles ont été proposés comme l'inactivation de canaux calciques de types L, *via* l'activation de la Protéine Kinase G (PKG), ce qui permettrait de stabiliser les membranes (Chik *et al.*, 1995). Il pourrait également augmenter la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire ( $Ca^{2+}$  i) *via* l'activation de canaux cationiques (Schaad *et al.*, 1995b). Un autre rôle intéressant a été démontré récemment : le GMPc stimule l'activation des MAPK p42/44 *via* la PKG, un mécanisme antagoniste de l'AMPc (Ho *et al.*, 2006). Ainsi, le GMPc, pourrait moduler l'activité de l'AA-NAT induite par l'augmentation d'AMPc. De plus, l'induction de *perl* dans la glande pinéale de rat dépend de cette activation des MAPK par le GMPc (Fukuhara *et al.*, 2002), un mécanisme similaire à celui observé dans les NSC (Gillette & Mitchell, 2002, pour revue).

### 2. Signalisation $\alpha$ -adrénergique

En plus des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, la glande pinéale exprime également des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques. L'activation de ces récepteurs ne permet pas à elle-seule de stimuler l'AMPc, l'activité de l'AA-NAT ou la synthèse de mélatonine, mais permet de potentialiser les effets de la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques chez le rat (**figure 12**; Klein *et al.*, 1983; Sugden *et al.*, 1984; Vanecek *et al.*, 1985). Le même mécanisme existe chez d'autres rongeurs comme le hamster syrien (Garidou *et al.*, 2003a; Santana *et al.*, 1989b; Stankov *et al.*, 1990). Cependant, ce rôle potentialisateur des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques n'est pas clairement établi chez le mouton (Morgan *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1988; Sugden *et al.*, 1985a) et n'est visible que sur l'activité de l'AA-NAT chez le boeuf (Schomerus *et al.*, 2002).

#### a) Expression des récepteurs $\alpha$ -adrénergiques dans la glande pinéale

Les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques sont des protéines à 7 domaines transmembranaires. Deux sous-types composent cette famille : les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques de type 1 majoritairement couplés à une protéine Go, activant la phospholipase C (PLC) et les les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques de type 2 majoritairement couplés à une protéine Gi, inhibant l'Adénylate Cyclase. Ces deux sous-familles comportent chacune 4 isoformes.

Les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques de type 1 sont présents sur la membrane des pinéaloctes (Sugden & Klein, 1984; Sugden *et al.*, 1985a). Les ARNm des sous-types 1A et 1B sont exprimés, mais seul le sous-type 1A semble traduit en protéine (Sugden *et al.*, 1996; Sugden & Klein, 1984). Elle présente un rythme journalier et circadien dépendant de la NA, avec un

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

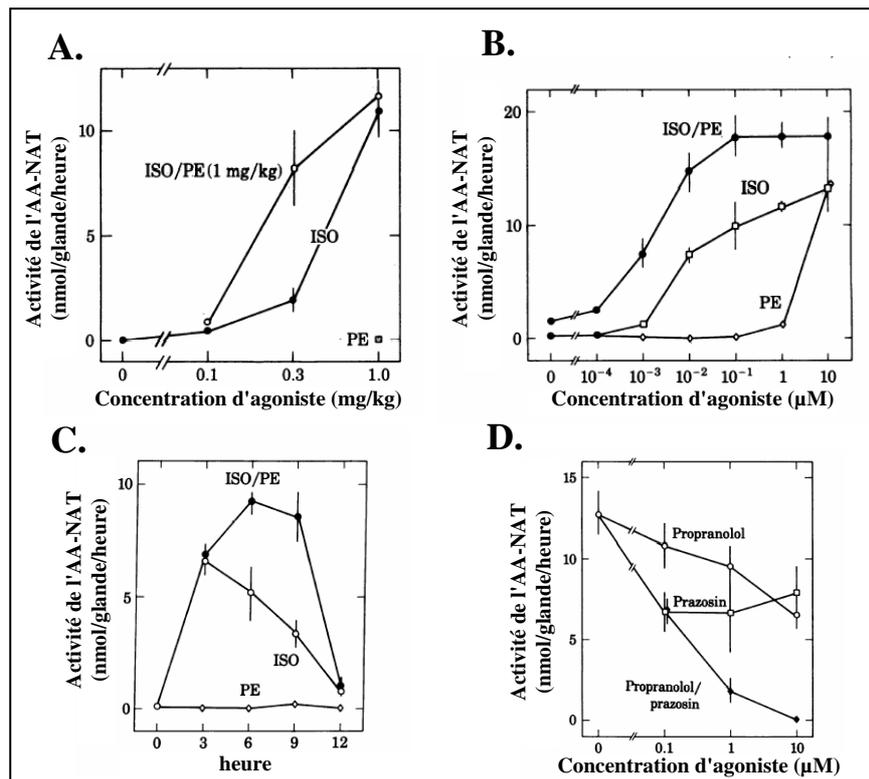


Figure 12 : La stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénrgiques potentialise l'effet de la stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénrgiques sur l'activité de l'AA-NAT dans la glande pinéale de rat. (A). Effet de concentrations croissantes d'isoprotérénol (ISO) en présence ou non de 1 mg/kg de phénylèphrine (PE) sur l'activité de l'AA-NAT *in vivo*. Les glandes pinéales sont prélevées 2h après l'injection. (B) Effet de concentrations croissantes d'ISO, de PE ou d'ISO/PE sur l'activité de l'AA-NAT sur des glandes pinéales de rat en culture. (C) Effet d'une dose optimale d'ISO, de PE ou d'ISO/PE en fonction de la durée de stimulation sur l'activité de l'AA-NAT sur des glandes pinéales de rat en culture. (D) Effet de concentrations croissantes de propranolol, de prazosine ou des deux en début de nuit sur l'activité de l'AA-NAT *in vivo*. Les glandes pinéales sont prélevées 2h après l'injection. (d'après Klein *et al.*, 1983)

maximum durant la nuit (Coon *et al.*, 1997). Chez le rat, la densité de ce récepteur ne présente aucune variation circadienne (**figure 11**), mais augmente en LL ou après une ganglionectomie (Pangerl *et al.*, 1990). Au contraire, chez le hamster syrien, la densité est maximale durant le jour (Pangerl *et al.*, 1990). Les récepteurs  $\alpha$ -adrénrgiques de type 2, sont présents majoritairement sur les terminaisons sympathiques (Schaad & Klein, 1992; Simonneaux *et al.*, 1991), où ils inhibent la libération de NA (Pelayo *et al.*, 1977). Ils sont également présent sur la membrane post-synaptique où ils stimulent la Guanylate Cyclase (Venkataraman *et al.*, 1998), l'activité de l'AA-NAT et la sécrétion de mélatonine (Schaad & Klein, 1992).

**b) Conséquences de l'activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques**

• **Augmentation du  $Ca^{2+}_i$**

La stimulation noradrénergique de la glande pinéale induit une élévation des niveaux de  $Ca^{2+}_i$  (Schaad *et al.*, 1993; Sugden *et al.*, 1987b), avec un premier pic rapide et transitoire suivi d'un plateau intermédiaire qui se prolonge tant que la NA est présente (**figure 13**, (Schomerus *et al.*, 1995; Sáez *et al.*, 1994). Elle dépend essentiellement de la stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, puisque la phényléphrine, et non l'isoprotérénol ou le dbcAMP, mime cette réponse (**figure 13**), alors que l'application de prazosine, un antagoniste des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, l'inhibe (Lee *et al.*, 2006; Sáez *et al.*, 1994; Sugden *et al.*, 1987b).

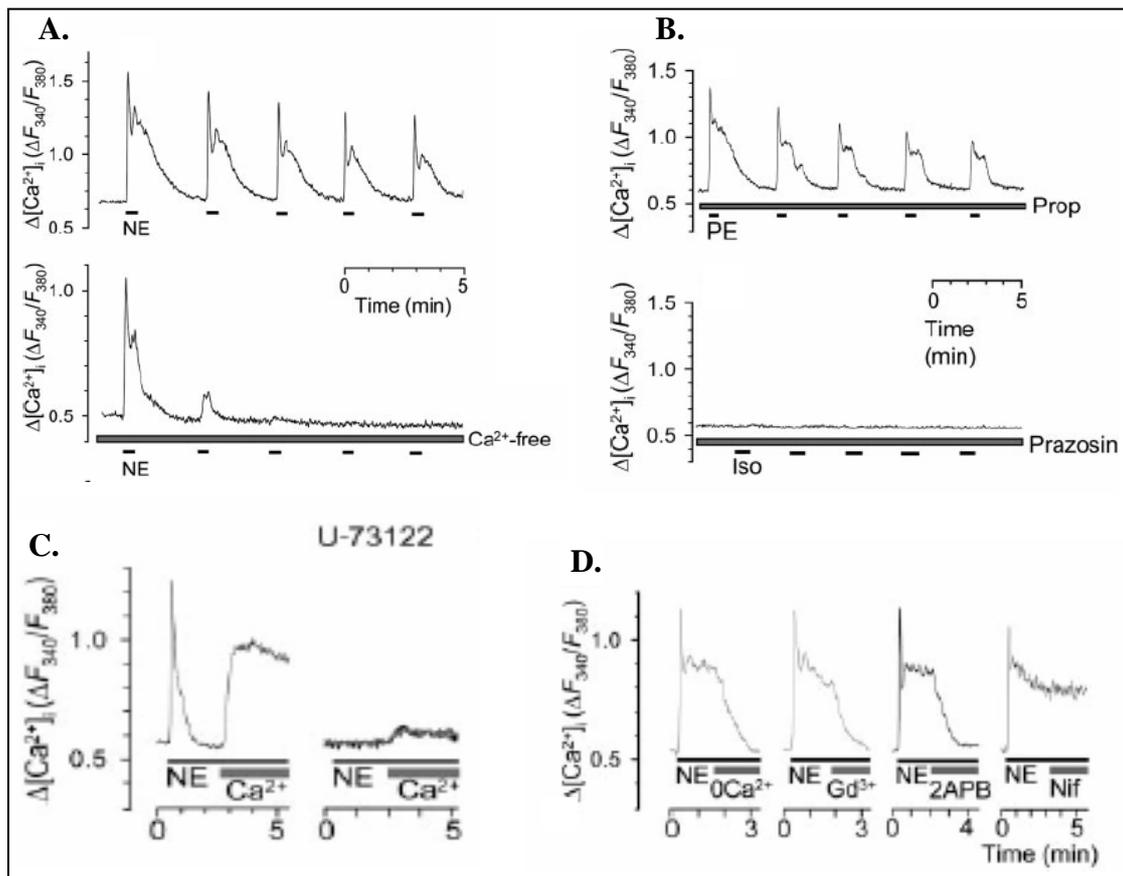
La réponse calcique des pinélocytes est dépendante à la fois des stocks intracellulaires et extracellulaires de  $Ca^{2+}$ . L'inhibition de l'influx de  $Ca^{2+}_e$  inhibe le plateau de la réponse (**figure 13**, Lee *et al.*, 2006; Schomerus *et al.*, 1995; Sáez *et al.*, 1994; Sugden *et al.*, 1987b). De plus, l'application de thapsigargine, un agent stimulant directement la libération des stocks intracellulaires dépendants de l'inositol triphosphate (IP3), mime les effets de la NA sur l'influx de  $Ca^{2+}_e$  (Ho *et al.*, 1996; Schomerus *et al.*, 1995). La libération des stocks intracellulaires est dépendante de la stimulation de la PLC (Ho *et al.*, 1988b; Smith *et al.*, 1979) : une inhibition de son activité abolit totalement les réponses calciques (**figure 13**, Lee *et al.*, 2006). La PLC clive les phosphatidylinositol en IP3 et DAG (diacylglycérol), et l'IP3 agit sur le RE pour libérer les stocks de  $Ca^{2+}$  (Ho *et al.*, 1988b; Schomerus *et al.*, 1995). Le calcium ainsi libéré active des canaux calciques membranaires responsables de l'influx du  $Ca^{2+}_e$  dans les cellules (Chik & Ho, 1989; Lee *et al.*, 2006).

• **Potentialisation de la production d'AMPC et de GMPc (figure 14)**

La suppression du  $Ca^{2+}_e$  ou l'application de prazosine diminue l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine (Klein *et al.*, 1983; Roseboom *et al.*, 1996; Zatz & Romero, 1978). Cependant, l'élévation du  $Ca^{2+}_i$  par des ionophores ou par la stimulation  $\alpha$ 1-adrénergique ne permet pas (ou très peu pas rapport à l'AMPC) à elle seule de stimuler ces mêmes paramètres.

La stimulation  $\beta$ -adrénergique produit une augmentation des concentrations intracellulaires en AMPC et en GMPc de 7 à 10 fois et 2 à 4 fois respectivement. Si cette stimulation est accompagnée d'une stimulation  $\alpha$ -adrénergique, l'augmentation passe alors à 100 fois (Vanecek *et al.*, 1985). Cette potentialisation est dépendante de l'augmentation du  $Ca^{2+}_i$ , car des agents chélateurs du  $Ca^{2+}_e$  ou des inhibiteurs des canaux calciques membranaires l'inhibent, et des agents augmentant artificiellement le  $Ca^{2+}_i$  la miment

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 13 : Réponses calciques enregistrées dans des pinéaloctes en culture.** Les réponses sont enregistrées par microfluorimétrie calcique avec la sonde Fura-A. Les résultats sont exprimés en ratio de fluorescence émise par le Fura-2 lié par rapport à celle du Fura-2 non lié ( $\Delta F_{340}/F_{380}$ ). **A.** Réponse calciques induites par la NA (NE) sur des pinéaloctes de rat en culture, en présence ou en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. **B.** Réponses calciques induites par la phényléphrine et l'isoprotérénol en présence respectivement de propranolol et de prazosine (assure la spécificité du récepteur stimulé). Les réponses calciques sont conduites par la stimulation  $\alpha 1$ -adrénergique. **C.** La stimulation noradrénergique induit un influx de calcium extracellulaire dépendant de la libération des stocks intracellulaires de calcium, elle-même dépendante de l'activation de la PLC. En l'absence de calcium extracellulaire, la NA n'induit que la libération des stocks intracellulaires (pic). Si l'on remet du calcium dans le milieu, la phase de plateau est alors observable. Si l'activité de la PLC est inhibée (U-73122), aucune des deux réponses n'est observée. **D.** L'inhibition de l'entrée du calcium dans les cellules ( $0\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Gd}^{3+}$ ) ainsi que de la libération des stocks intracellulaires (2APB) en cours de réponse provoque une inhibition immédiate de la réponse calcique. L'entrée de calcium dans la cellule ne se fait que par des canaux calciques sensibles à la nifédipine. (d'après Lee et al., 2006)

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

(Ho *et al.*, 1987 ; Ho *et al.*, 1988c ; Sugden *et al.*, 1986 ; Ho *et al.*, 1996;). La stimulation noradrénergique induit une translocation de la PKC à la membrane plasmique et une augmentation de son activité (**figure 14**, Ho *et al.*, 1987; Ho *et al.*, 1988a; Ho & Klein, 1987b; Ho *et al.*, 1988c; Sugden *et al.*, 1985b). L'activation de la PKC se ferait préférentiellement par le  $Ca^{2+}$ , et dans une moindre mesure par le DAG (Ho *et al.*, 1988c).

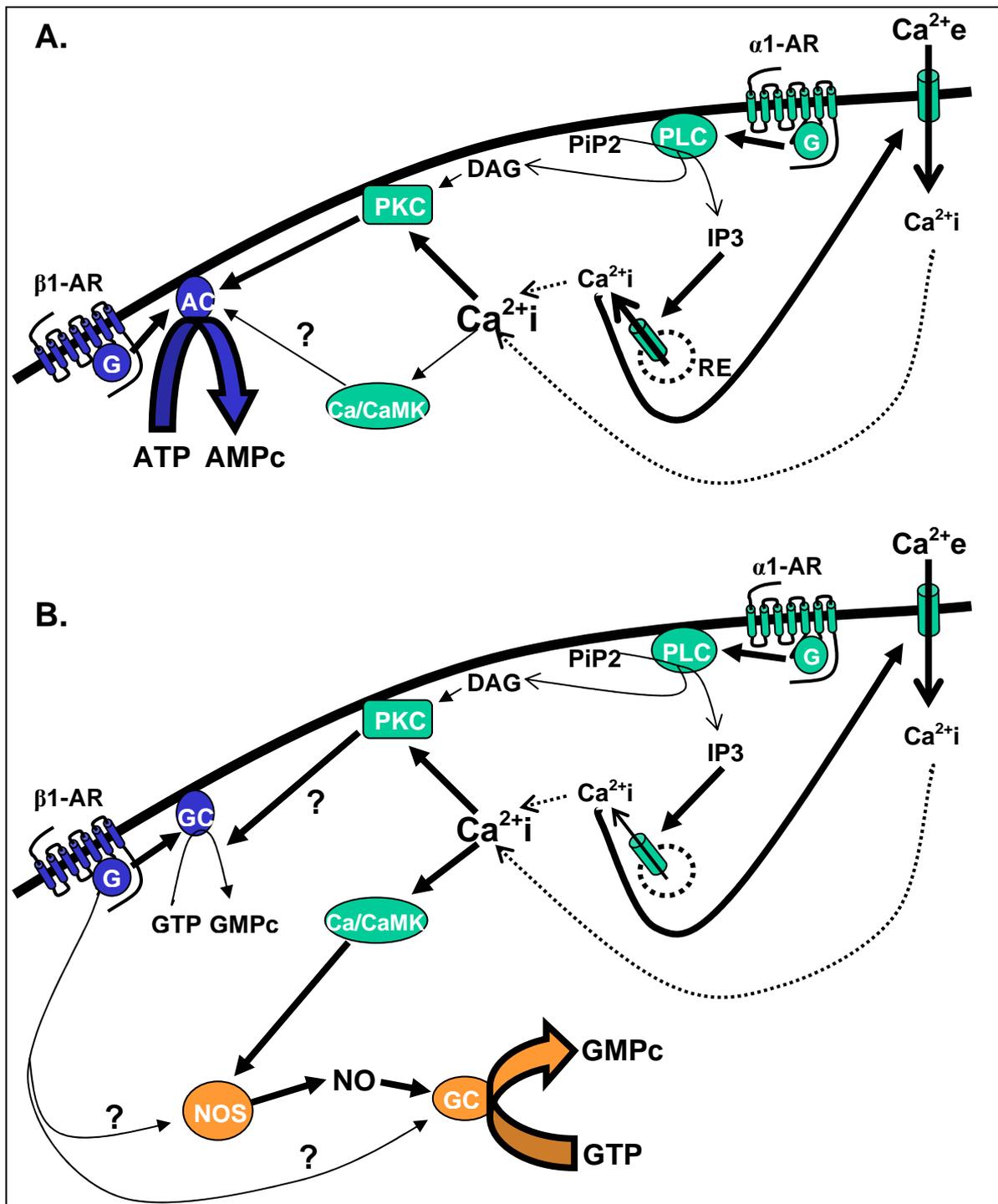
En ce qui concerne l'AMPc, le mécanisme de potentialisation implique une stimulation de la PKC par le  $Ca^{2+}$ , et la PKC agirait en retour soit sur la protéine G soit sur l'Adénylate Cyclase pour stimuler leur activité (**figure 14**). En effet, une stimulation directe de la PKC potentialise l'accumulation d'AMPc induite par la toxine cholérique (un activateur des protéines Gs) ou par la forskoline (un activateur de l'Adénylate Cyclase) (Sugden & Klein, 1988). Cependant, il est également probable que la Ca/CaMK module l'activité de l'Adénylate Cyclase, puisque son activation par le  $Ca^{2+}$  potentialise légèrement l'AMPc (Ho *et al.*, 1991; Tzavara *et al.*, 1996).

L'effet sur le GMPc est un peu plus complexe et nécessite à la fois l'augmentation de  $Ca^{2+}$  et l'activation de la PKC. L'activation de cette dernière n'induit qu'un faible effet potentialisateur (Ho *et al.*, 1987; Ho *et al.*, 1988a), impliquant la phospholipase A2 et les métabolites de l'acide arachidonique, stimulant la Guanylate Cyclase (Chik *et al.*, 1991; Ho & Klein, 1987a). Un autre mécanisme implique une activation de la NOS ("Nitric Oxyde Synthase"), activant une Guanylate Cyclase cytosolique et stimulant la production de GMPc (**figure 14**, Ho *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994; Spessert *et al.*, 1993; White & Klein, 1995). Cet effet est dépendant de la stimulation de la voie  $\beta$ -adrénergique, qui induit la sensibilisation de la NOS au complexe Ca/CaMK (Lin *et al.*, 1994; Schaad *et al.*, 1995a) et/ou de l'activité de la Guanylate Cyclase, via la protéine Gs (White & Klein, 1995), indépendamment de la production d'AMPc.

### • *Autres effets du $Ca^{2+}$*

En parallèle de ses effets potentialisateurs sur l'accumulation des nucléotides cycliques, le  $Ca^{2+}$  induit également d'autres effets pouvant avoir un rôle dans la modulation de la synthèse de mélatonine. Premièrement, le  $Ca^{2+}$  active un canal potassique, créant ainsi un efflux de potassium responsable d'une hyperpolarisation de la membrane (Ceña *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2006; Parfitt *et al.*, 1975). En plus, il provoque une alcalinisation du cytosol *via* l'activation d'un échangeur  $Na^+/H^+$  dont l'inhibition réduit la synthèse de mélatonine (Ho & Chik, 1992; Ho *et al.*, 1989). Par ailleurs, le  $Ca^{2+}$  est directement ou indirectement impliqué dans la stimulation de certains facteurs de transcription intervenant dans la transcription de l'*Aa-nat*.

II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 14 : Voies de signalisation conduisant à la potentialisation de la formation d'AMPc (A) et de GMPc (B) dans des pinéaloctes de rat.** Les flèches pleines représentent une activation et l'épaisseur des flèches est corrélée à l'importance du mécanisme dans la production de ces deux messagers secondaires. Les ? représentent un effet connu mais dont le mécanisme n'est pas encore expliqué.  $\alpha$ AR : récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques; AC : Adénylate Cyclase; AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique;  $\beta$ AR : récepteurs  $\beta$ -adrénergiques;  $Ca^{2+}$  : calcium; Ca/CaMK : "Calcium/Calmoduline Kinase"; DAG : Diacylglycérol; GC : Guanylate Cyclase; GMPc : Guanosine monophosphate cyclique; IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate; NOS : "Nitric Oxyde Synthase"; PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol biphosphate; PKA : Protéine Kinase AMPc-dépendante; PKC : Protéine Kinase C; PKG : Protéine Kinase G; PLC : Phospholipase C.

### 3. Conséquences sur l'activité des enzymes de synthèse de la mélatonine

#### a) Régulation noradrénergique de l'AA-NAT

- **Régulation transcriptionnelle**

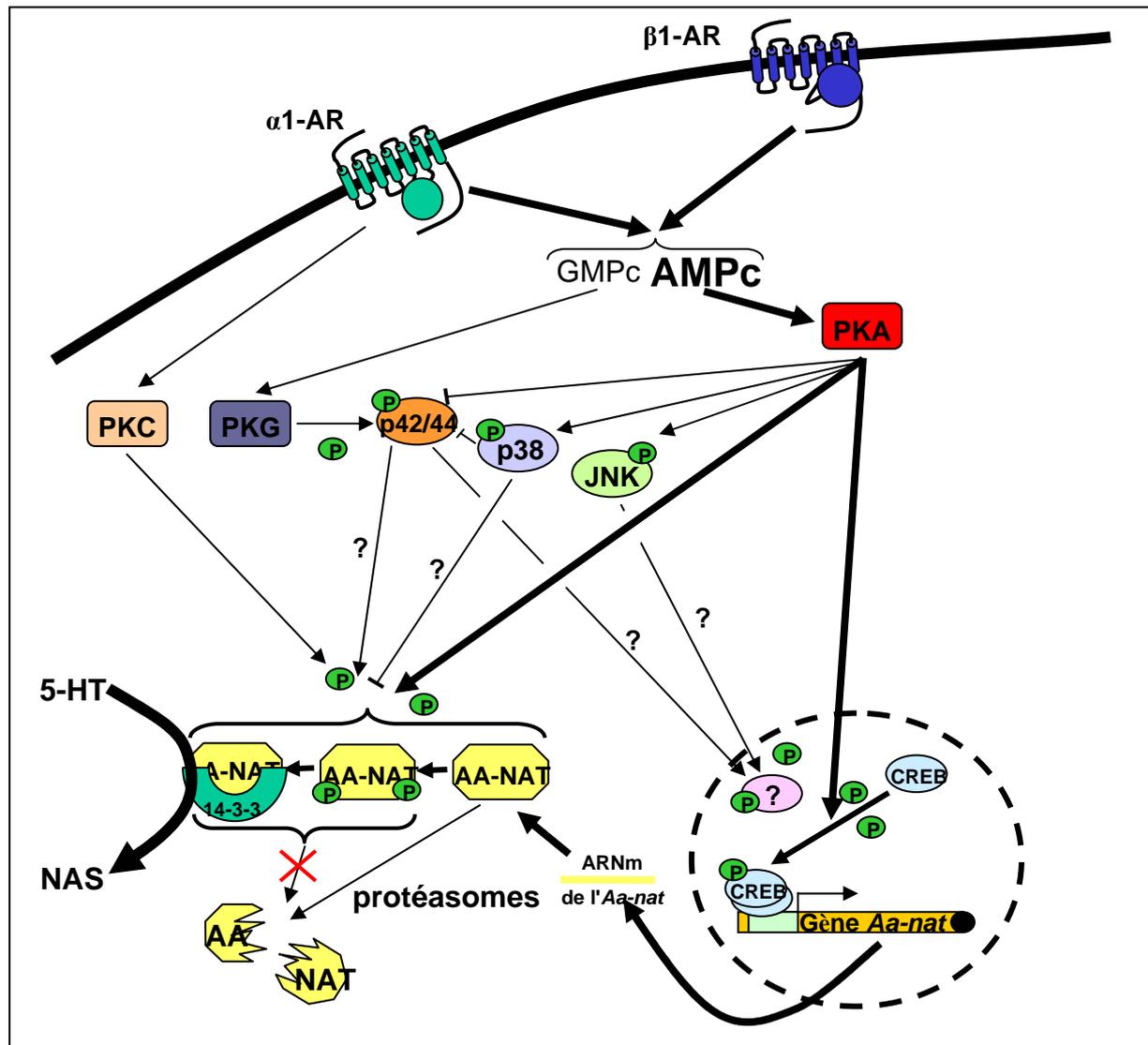
La stimulation noradrénergique de glandes pinéales *in vivo* ou *in vitro* induit une augmentation de la transcription de l'*Aa-nat* chez la majorité des espèces. Cependant, l'amplitude de cette augmentation diffère énormément selon l'espèce considérée. En effet, chez le rat et d'autres rongeurs, l'expression de l'*Aa-nat* est très basse, voire indétectable de jour ou en condition non stimulée, et augmente fortement (entre 100 et 150 fois) de nuit ou après stimulation (Garidou *et al.*, 2003b; Garidou *et al.*, 2002a; Garidou *et al.*, 2003c; Roseboom *et al.*, 1996). Chez les ongulés, l'expression de l'ARNm est déjà élevée de jour ou en condition non stimulée et augmente de 50% de nuit ou après stimulation noradrénergique (Coon *et al.*, 1995; Craft *et al.*, 1999; Privat *et al.*, 1999). Aucune augmentation n'a été détectée chez les primates (Coon *et al.*, 1996; Coon *et al.*, 2002).

Chez les rongeurs, la transcription de l'*Aa-nat* dépend essentiellement de l'accumulation d'AMPC. Cependant, une stimulation  $\alpha$ -adrénergique stimule très légèrement la transcription de l'*Aa-nat*, suggérant donc une possible intervention du calcium dans ce mécanisme (Roseboom *et al.*, 1996). De même, l'effet potentialisateur de la stimulation  $\alpha$ -adrénergique sur la stimulation  $\beta$ -adrénergique est minimal, puisqu'un antagoniste  $\alpha$ -adrénergique n'a pas d'effet sur les niveaux d'ARNm induits par une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Roseboom *et al.*, 1996). La stimulation noradrénergique, *via* la formation d'AMPC, active la PKA de type II (Maronde *et al.*, 1997b; Maronde *et al.*, 1999c; Schomerus *et al.*, 2002). Les sous-unités catalytiques et régulatrices de cette protéine se séparent et les premières transloquent dans le noyau pour phosphoryler le facteur de transcription CREB, qui se fixe alors sur le promoteur de l'*Aa-nat* et induit la transcription (**figure 15**, voir **section III.B**, Baler *et al.*, 1997; Maronde *et al.*, 1999a; Maronde *et al.*, 1997b; Roseboom & Klein, 1995; Schomerus *et al.*, 2003).

- **Régulation post-traductionnelle**

La quantité de protéines et l'activité enzymatique de l'AA-NAT, augmentent fortement de nuit ou suite à une stimulation noradrénergique chez toutes les espèces, indépendamment des mécanismes de régulation de l'expression du gène. Les niveaux sont indétectables de jour ou sans stimulation et augmentent d'environ 10 fois chez les ongulés et les primates, et de 50 à 70 fois chez les rongeurs, de nuit ou suite à la stimulation noradrénergique (Klein *et al.*, 1997; Simonneaux & Ribelayga, 2003). Là encore, l'activation de la voie AMPC/PKA tient un rôle

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 15 : Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'AA-NAT dans la glande pinéale de rat.** La figure représente les événements cellulaires et moléculaires régulant la néosynthèse de l'AA-NAT, l'enzyme limitante dans l'initiation et l'arrêt de la synthèse de mélatonine. Dans un souci de clarté, les aspects concernant la formation de l'AMPc et du GMPc ont été simplifié et sont représentés en figure 14. Les flèches pleines représentent une activation et les flèches barrées une inhibition. Les ? représentent un effet connu mais dont le mécanisme n'est pas encore expliqué. L'AA-NAT est régulée par différentes kinases agissant de concert soit pour activer l'enzyme par phosphorylation, soit pour activer la transcription du gène *Aa-nat* via l'activation de facteurs de transcription. αAR : récepteurs α-adrénergiques; AA-NAT : Arylalkylamine-N-acétyltransférase; AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique; βAR : récepteurs β-adrénergiques; CREB : "cAMP responsive element binding protein"; GMPc : Guanosine monophosphate cyclique; 5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine; JNK : "c-JUN N-terminal Kinase"; NAS : N-acétyl-sérotonine; PKA : Protéine Kinase AMPc-dépendante; PKC : Protéine Kinase C; PKG : Protéine Kinase G; 14-3-3 : protéine 14-3-3.

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

majeur. En effet, la PKA phosphoryle directement la protéine AA-NAT sur ses extrémités N- et C-terminales (Klein, 2007 pour revue). Cette phosphorylation favorise la fixation de la protéine chaperonne 14-3-3, qui permet à la fois l'activation de l'AA-NAT, mais également une protection de l'enzyme contre la dégradation par les protéasomes (**figure 15**, Ganguly *et al.*, 2002; Ganguly *et al.*, 2001; Ganguly *et al.*, 2005; Gastel *et al.*, 1998; Klein, 2007; Klein *et al.*, 2002; Obsil *et al.*, 2001; Schomerus *et al.*, 2000). Cependant, la PKA ne serait pas la seule à agir directement sur la protéine AA-NAT. En effet, la stimulation de l'activité de l'AA-NAT par le dbcAMP est potentialisée par des ionophores du  $\text{Ca}^{2+}$ , démontrant un mécanisme en aval de la formation de l'AMPc et de l'activation de la PKA, directement par le calcium ou *via* la PKC (Yu *et al.*, 1993). De plus une activation directe de la PKC par le PMA augmente l'activité de l'AA-NAT *via* sa phosphorylation chez le bœuf et le rat (Choi *et al.*, 2004; Schomerus *et al.*, 2004). Ces modifications post-traductionnelles complémentaires expliquent certainement pourquoi la potentialisation de l'activité de l'AA-NAT est plus importante que l'effet observé sur les ARNm (Roseboom *et al.*, 1996; Schomerus *et al.*, 2002).

### • Modulation de l'activité de l'AA-NAT par les MAPK (*figure 15*)

Trois MAPK sont exprimées dans la glande pinéale du rat : p42/44 (ERK ½: "Extracellular signal Regulated Kinase"), p38 et JNK ("c-JUN N-terminal Kinase"). p42/44 et p38 sont régulées par la NA, avec cependant des mécanismes différents (Ho *et al.*, 2006). *In vitro*, p42/44 est activée (par phosphorylation) dès 15 minutes après une stimulation noradrénergique, alors que l'expression de p38 n'augmente qu'après 2 heures (Chik *et al.*, 2004; Ho & Chik, 2000). *In vivo*, l'activité de p42/44 augmente 2 heures après le début de la nuit et son activation reste soutenue pendant 8 heures (Ho *et al.*, 2003b) alors que celle de p38 n'augmente qu'après 6 heures (Chik *et al.*, 2004). p42/44 est activée par la voie GMPc/PKG (Ho & Chik, 2000), alors que p38 est activée par l'AMPc et le  $\text{Ca}^{2+}$ , indépendamment de la PKC (Chik *et al.*, 2004). L'inhibition de la phosphorylation de p42/44 ne diminue pas l'activité de l'AA-NAT mais provoque un délai dans son activation, suggérant que p42/44 module le taux d'induction de l'activité de l'AA-NAT (Ho *et al.*, 2003a; Ho *et al.*, 2003b). En ce qui concerne p38, son inhibition augmente l'activité de l'AA-NAT 6 heures après le début de la stimulation par la NA, suggérant un rôle dans la régulation de l'amplitude du rythme d'activité de l'AA-NAT, voire dans la régulation de la durée du rythme *in vivo* (Man *et al.*, 2004). Son action pourrait également se faire *via* l'inhibition de l'effet de p42/44 (Mackova *et al.*, 2000).

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

L'activation de JNK est induite par la voie AMPc/PKA 20 minutes après la stimulation noradrénergique (Chansard *et al.*, 2005). L'inhibition de cette kinase diminue la transcription de l'*Aa-nat*. Un des rôles majeurs de JNK est de phosphoryler la protéine c-JUN, un facteur de transcription de la famille AP-1. Ainsi, son action pourrait se faire par le contrôle transcriptionnel de l'*Aa-nat* *via* c-JUN (voir **section III**, et **section I.B de la discussion**).

### b) Régulation noradrénergique de la TpOH et de l'HIOMT

L'ARNm de la TpOH est exprimé avec un fort niveau basal augmentant faiblement (15 à 20%) suite à une stimulation noradrénergique (Besançon *et al.*, 1995; Besançon *et al.*, 1996). Cette augmentation se produit suite à l'augmentation d'AMPc dans les cellules et fait intervenir les facteurs de transcription NF-Y et Sp1 au lieu de la voie classique impliquant la phosphorylation de CREB (Côté *et al.*, 2002). Il en est de même pour l'expression basale. L'augmentation de 2 fois de l'activité durant la nuit et suite à la stimulation noradrénergique se fait *via* la phosphorylation de la protéine par la PKA (Ehret *et al.*, 1991).

L'expression basale de l'*Hiomt* est élevée, et la stimulation noradrénergique provoque une augmentation de 2 fois de l'expression de l'ARNm, probablement *via* la phosphorylation de CREB (Gauer & Craft, 1996; Ribelayga *et al.*, 1999b). Contrairement à l'ARNm, l'activité de la protéine, déjà élevée en conditions basales, n'est pas stimulée par une application aiguë d'agonistes adrénergiques (Klein *et al.*, 1970a; Klein *et al.*, 1970b; Ribelayga *et al.*, 1997), mais l'activité est augmentée d'environ 40% la nuit par des mécanismes indépendants de la NA et impliquant probablement le NPY (Ribelayga *et al.*, 1999a; Ribelayga *et al.*, 1999b).

## D. Régulation journalière du rythme de sécrétion de mélatonine

### 1. Initiation de la synthèse en début de nuit

*In vivo*, l'initiation de la synthèse de mélatonine est principalement induite suite à la libération de NA contrôlée par les NSC. L'action de la NA sur ses récepteurs active les voies de signalisation décrites précédemment et induit, *via* l'accumulation d'AMPc, l'activation des enzymes de synthèse de la mélatonine. Etant donné la forte activité basale de la TpOH et de l'HIOMT, l'évènement majeur permettant l'initiation de la synthèse de mélatonine est l'activation de l'AA-NAT (Klein *et al.*, 1997). Chez toutes les espèces de mammifères étudiées, la mélatonine augmente significativement durant la nuit, mais son délai d'apparition est plus ou moins long selon l'espèce.

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

Chez les ongulés, les niveaux d'ARNm de l'*Aa-nat* sont élevés durant le jour et augmentent faiblement durant la nuit. Cependant, cette faible augmentation n'est pas nécessaire à l'initiation de la synthèse de mélatonine, car l'application d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, sur des pinéaloctes en culture n'inhibe ni la traduction de la protéine AA-NAT ni la synthèse de mélatonine induites par la NA (Schomerus *et al.*, 2000). L'initiation de la synthèse de mélatonine chez les ongulés semble donc régulée au niveau traductionnel ou post-traductionnel. En effet, l'application d'un inhibiteur des protéasomes augmente l'expression de la protéine AA-NAT et la synthèse de mélatonine dans des pinéaloctes de bœuf (Schomerus *et al.*, 2000). Ainsi, que ce soit de jour ou de nuit, les niveaux élevés de l'ARNm de l'*Aa-nat* permettent une traduction continue de la protéine AA-NAT. De jour, celle-ci est dégradée par les protéasomes, d'où les faibles niveaux de protéine et d'activité enzymatique. En revanche, de nuit, suite à la stimulation par la NA, la PKA phosphoryle l'AA-NAT, favorisant sa liaison à la protéine 14-3-3 qui lui assure une protection de la dégradation par les protéasomes (Ganguly *et al.*, 2001). Chez les ongulés et les primates (extension du modèle), la synthèse de mélatonine est donc régulée majoritairement par un mécanisme post-traductionnel ne nécessitant pas de néotranscription de l'*Aa-nat*. De ce mécanisme résulte une activation rapide de l'activité de l'AA-NAT et de la synthèse de la mélatonine, qui surviennent moins d'une heure après le début de la nuit (Klein *et al.*, 1997).

La synthèse de mélatonine chez les rongeurs ne démarre pas aussi rapidement que chez les ongulés et nécessite un délai d'au moins 2-4 heures ou plus suivant l'espèce (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Chez le rat et le hamster syrien, l'injection *in vivo* d'actinomycine D en début de nuit inhibe totalement l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine (Gonzalez-Brito *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 1975). Le délai observé dans l'induction de la synthèse de mélatonine est donc dû à la néotranscription de l'*Aa-nat*. Une néotraduction de la protéine est également nécessaire, vu qu'une inhibition de la synthèse protéique inhibe la synthèse de mélatonine, que ce soit en début ou en milieu de stimulation (Gonzalez-Brito *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 1975; Roseboom *et al.*, 1996). De plus, la stabilité de la protéine AA-NAT dépend également de sa protection contre les protéasomes par les mêmes mécanismes que ceux décrits chez les ongulés (Gastel *et al.*, 1998). Ainsi, chez les rongeurs, un double mécanisme permet l'induction de la synthèse de mélatonine : une néotranscription de l'*Aa-nat* et une régulation post-traductionnelle de la protéine AA-NAT (**figure 15**).

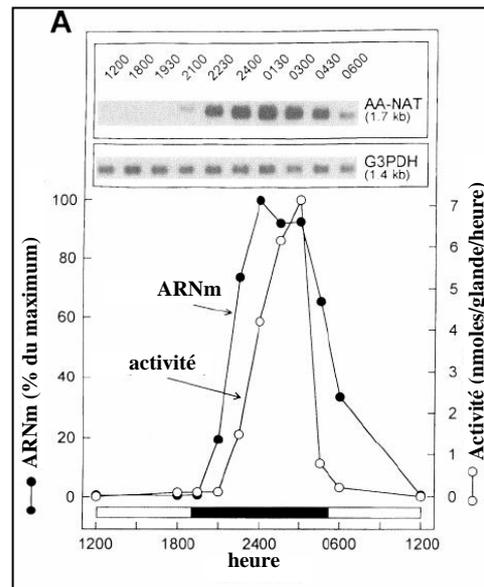
## **2. Arrêt de la synthèse en fin de nuit**

En fin de nuit, les quantités de mélatonine chutent brutalement pour revenir à un niveau basal, quelle que soit l'espèce considérée. Chez le rat, l'arrêt de la sécrétion de mélatonine débute avant l'arrivée du jour (Ribelayga *et al.*, 1999a; Tamarkin *et al.*, 1985), alors que chez les hamsters syrien et sibérien, il débute avec son arrivée en photopériode longue et avant en photopériode courte (Illnerová *et al.*, 1984; Miguez *et al.*, 1995). Malgré ces différences, l'arrêt de la synthèse de mélatonine résulte du même mécanisme chez toutes les espèces.

En fin de nuit, chez le rat, le contenu en NA et sa libération diminuent (Craft *et al.*, 1984; Drijfhout *et al.*, 1996a; Drijfhout *et al.*, 1996b). La prolongation de la synthèse de mélatonine à la transition nuit/jour et en début de jour est possible par l'infusion d'agonistes adrénergiques sur la glande pinéale *in vivo* (Perreau-Lenz *et al.*, 2005), ce qui démontre bien le rôle de l'arrêt de la libération de NA dans l'arrêt de la synthèse de mélatonine en fin de nuit. L'inhibition de la synthèse de mélatonine peut être mimée *in vivo* par l'application d'antagonistes des récepteurs adrénergiques ou par l'application d'un flash de lumière, ou *in vitro* par remplacement du milieu de culture par un milieu sans NA. Ces trois traitements résultent en une inhibition rapide (de 5 à 15 minutes) de l'accumulation d'AMPc, de l'activité de la PKA et de l'activité de l'AA-NAT (Gastel *et al.*, 1998; Illnerová *et al.*, 1979; Klein *et al.*, 1978; Klein & Weller, 1972). La diminution de l'activité de l'AA-NAT en fin de nuit est stoppée par des inhibiteurs des protéasomes (Gastel *et al.*, 1998). De plus, en fin de nuit, la PKA n'est plus activée par l'AMPc et n'active plus CREB, qui est également déphosphorylé par des phosphatases (Koch *et al.*, 2003; Maronde *et al.*, 1999b; Maronde *et al.*, 1997b). En parallèle, l'accumulation d'ICER, un facteur de transcription inhibiteur entrant en compétition avec CREB pour l'accès aux sites CRE ("cAMP Responsive Element") des promoteurs, pourrait participer à l'inhibition de la transcription de l'*Aa-nat* (voir **section III.C**). Cependant, la diminution de l'activité de l'AA-NAT s'effectue avant la diminution de la quantité d'ARNm, lesquels ont une demi-vie de 2,5 heures (**figure 16**, Roseboom *et al.*, 1996), ce qui exclut que l'arrêt de la synthèse de mélatonine dépende de la diminution des ARNm de l'AA-NAT.

En parallèle, d'autres mécanismes participent à l'arrêt de la synthèse de la mélatonine. La densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques diminue en fin de nuit par des mécanismes de désensibilisation et de recyclage diminuant ainsi la formation d'AMPc (Pangerl *et al.*, 1990). Un mécanisme de désensibilisation a été démontré pour la PKC, diminuant la sensibilité de la voie calcique en fin de nuit (Sugden, 1991). De plus, l'activité des phosphodiesterases augmente en fin de nuit, participant à la diminution d'AMPc (Kim *et al.*, 2007).

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 16 : Rythme journalier de l'expression de l'ARNm et de l'activité de l'AA-NAT dans la glande pinéale de rat.** L'ARNm est exprimé dès 2 heures après le début de la nuit et atteint un maximum en milieu de nuit. Une diminution de l'expression a lieu en fin de nuit, avant le début du jour, et les valeurs retournent à leur niveau basal en début de jour. L'activité de l'AA-NAT suit parfaitement l'augmentation de l'ARNm en début de nuit et atteint un maximum durant la deuxième moitié de la nuit. Cependant, le déclin observé dans l'activité anticipe la diminution de l'ARNm, supposant donc qu'elle n'est pas due à la diminution de la transcription de l'ARNm codant l'enzyme. (d'après *Roseboom et al., 1996*)

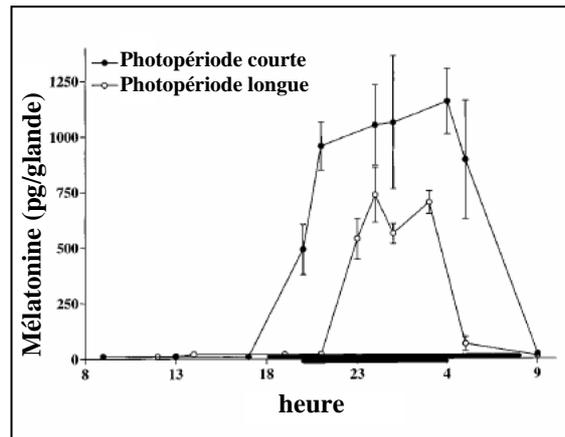
L'arrêt de la synthèse de mélatonine en fin de nuit résulte donc principalement de l'arrêt de la libération de la NA, qui se traduit par une diminution des niveaux d'AMPC et une inactivation de la PKA. L'AA-NAT, n'étant plus protégée par son interaction avec la protéine 14-3-3, est rapidement dégradée par les protéasomes. Bien que les activités enzymatiques de la TpOH et de l'HIOMT soient également diminuées en fin de nuit, c'est l'inhibition de l'activité de l'AA-NAT qui est responsable de l'arrêt de la synthèse de mélatonine.

### E. La synthèse de mélatonine au cours des saisons

#### 1. Variations dans la durée du pic de sécrétion

Chez la plupart des espèces, la glande pinéale traduit l'information photopériodique en durée de synthèse de mélatonine : plus la nuit s'allonge et plus la durée de synthèse de mélatonine est longue (**figure 17**), jusqu'à un maximum dépendant de l'espèce (rat : *Illnerová*

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères



**Figure 17 : Rythme de synthèse de mélatonine dans la glande pinéale de hamster sibérien en photopériode longue et courte.** La durée de synthèse de mélatonine correspond parfaitement à la durée de la nuit : longue en photopériode courte et courte en photopériode longue. En plus de cette différence dans la durée de synthèse, la quantité de mélatonine augmente en photopériode courte. Les barres noires représentent la période nocturne. (d'après Rybelayga *et al.*, 2000)

Illnerová & Vanecek, 1980; hamster sibérien : Illnerová *et al.*, 1984; Ribelayga *et al.*, 2000; hamster syrien : Brainard *et al.*, 1982; Miguez *et al.*, 1995; hamster d'Europe : Vivien-Roels *et al.*, 1992). L'allongement de la synthèse de mélatonine est toujours corrélé à un allongement de la durée du pic d'expression de l'ARNm et de l'activité de l'AA-NAT.

Chez le rat, le délai observé entre le début de la nuit et l'initiation de la synthèse de mélatonine s'allonge lorsque la durée de la nuit augmente, alors que l'arrêt de la synthèse débute toujours avant la fin de la nuit (Illnerová & Vanecek, 1980). Ceci est dû la transcription de l'*Aa-nat*, dont le délai d'induction varie exactement de la même manière (Engel *et al.*, 2004a; Ribelayga *et al.*, 1999a). Chez cette espèce, quelle que soit la photopériode, la glande pinéale peut être stimulée en début de nuit par l'isoprotérénol, suggérant une libération plus tardive de la NA en photopériode courte (Illnerová & Vanecek, 1983). Par ailleurs, la phosphorylation de CREB est plus faible en photopériode courte (Foulkes *et al.*, 1996b), sans doute à cause d'une activité plus faible de la PKA (Engel *et al.*, 2004b), ce qui expliquerait le délai dans la transcription de l'*Aa-nat*. Enfin, ce délai pourrait également être dû à une accumulation du répresseur ICER en début de nuit en photopériode courte (voir **section III.C.3**, Foulkes *et al.*, 1996b). Chez le hamster sibérien, le délai en début de nuit varie de la même manière que chez le rat, mais l'arrêt de la synthèse débute avec l'arrivée de la lumière en photopériode longue (Illnerová *et al.*, 1984). Chez le hamster syrien, le délai d'initiation de la transcription de l'*Aa-nat* et de la synthèse de mélatonine est identique

en photopériode longue et courte (Garidou *et al.*, 2003a; Miguez *et al.*, 1995), et l'arrêt est initié par la lumière en photopériode longue et par l'horloge en photopériode courte. Ces variations dans la durée du pic d'expression de l'*Aa-nat* sont certainement conduites par un changement du fonctionnement de l'horloge selon la photopériode (voir **section I**), qui induirait une modification de la libération de la NA.

### 2. Variations dans l'amplitude du pic de sécrétion

La synthèse de mélatonine est également caractérisée par une variation photopériodique de son amplitude chez certaines espèces (**figure 17**). Chez le rat, outre l'augmentation dans la durée, il y a une augmentation de la quantité de mélatonine sécrétée (Ribelayga *et al.*, 1999a). Cette augmentation est associée à celle de l'activité de l'HIOMT et non de l'AA-NAT dont la transcription et l'activité diminuent. Ce phénomène est encore plus important chez le hamster sibérien, où la quantité de mélatonine en photopériode courte est deux fois plus élevée qu'en photopériode longue (Illnerová *et al.*, 1984; Míguez *et al.*, 1996; Ribelayga *et al.*, 2000).

Cette augmentation n'est pas conduite par l'AA-NAT car sa transcription et son activité, sont fortement diminuées en photopériode courte (Illnerová *et al.*, 1984; Ribelayga *et al.*, 2000). Au contraire, l'activité de l'HIOMT est doublée en photopériode courte, ce qui démontre bien que les variations photopériodiques de l'amplitude du pic nocturne de mélatonine sont conduites par une variation de l'activité de l'HIOMT et non de l'AA-NAT.

Chez le hamster d'Europe, l'activité de l'HIOMT augmente (80%) en photopériode courte (Ribelayga *et al.*, 1998b), mais ceci ne semble pas être la cause principale du changement dans l'amplitude du pic de mélatonine. En effet, chez cette espèce, la transcription nocturne de l'*Aa-nat* et son activité sont très faibles en photopériode longue et augmentent très fortement en photopériode courte (Garidou *et al.*, 2003c). De plus, il est possible d'augmenter l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine en photopériode longue, à des niveaux équivalents à ceux observés en photopériode courte, par une injection nocturne d'isoprotérénol. Ceci suggère que la variation dans l'amplitude du pic de mélatonine est due à une modification des quantités de NA libérées. Néanmoins, l'augmentation de l'activité de l'HIOMT en photopériode courte participe également à la régulation photopériodique de l'amplitude de la synthèse de mélatonine chez cette espèce (Garidou *et al.*, 2003c; Ribelayga *et al.*, 1998b). L'activité de l'HIOMT n'est pas régulée à court terme par la NA, mais sur plusieurs jours ou plusieurs semaines. Ainsi, l'augmentation de la durée de synthèse de l'ARNm de l'*Hiomt* en photopériode courte entraîne une accumulation de protéines plus importante, et donc une

## II. Régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères

augmentation de l'activité générale d'environ 40% en photopériode courte chez le rat (Ribelayga *et al.*, 1999a). Le même mécanisme a été suggéré chez le hamster d'Europe et le hamster sibérien (Ribelayga *et al.*, 1998b; Ribelayga *et al.*, 2000).

Cependant, la NA ne serait pas le seul neurotransmetteur impliqué. En effet, si chez le rat la NA ne régule pas l'activité de l'HIOMT à court terme, le NPY exerce un effet marqué. Dans la glande pinéale, le NPY inhibe l'accumulation d'AMPc induite par la stimulation  $\beta$ -adrénergique, augmente le  $Ca^{2+}$ i et inhibe la libération de NA (Simonneaux *et al.*, 1994; Simonneaux *et al.*, 1999), causant ainsi une inhibition de l'activité de l'AA-NAT (Reuss & Schröder, 1987) et une augmentation de l'activité de l'HIOMT (Ribelayga *et al.*, 1997). De plus, chez le hamster d'Europe, l'innervation NPYergique de la glande pinéale est plus abondante en photopériode courte, alors que la NA reste constante (Moller *et al.*, 1998; Ribelayga *et al.*, 1998b). Ainsi, le NPY pourrait participer aux variations photopériodiques de l'activité de l'HIOMT et réguler l'amplitude du pic de mélatonine.

### **F. Conclusion : la NA régule le rythme de synthèse de mélatonine par le contrôle de l'activation de l'AA-NAT**

La synthèse de mélatonine dans la glande pinéale est régulée par plusieurs voies de signalisation dont le point de convergence est la régulation des enzymes catalysant sa synthèse. Bien que la NA soit le neurotransmetteur principal, d'autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs agissent sur ces voies de signalisation et modulent positivement et/ou négativement la synthèse de mélatonine (Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revue). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur le rôle physiologique de ces modulateurs dans le contrôle du rythme endogène de synthèse de mélatonine.

D'un point de vue cellulaire et moléculaire, la synthèse rythmique de mélatonine est principalement contrôlée par l'activation de l'AA-NAT, l'enzyme limitante dans la genèse du rythme de mélatonine. Cette régulation de l'activité de l'AA-NAT fait intervenir à la fois des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels, dont l'importance varie en fonction de l'espèce considérée (ongulés *versus* rongeurs). Le rôle de l'HIOMT est également important dans la régulation photopériodique de l'amplitude du pic de mélatonine. En fait, ces deux enzymes peuvent être considérées comme limitantes de la synthèse de la mélatonine, mais à des niveaux différents. L'AA-NAT contrôle l'initiation et l'arrêt de la synthèse (interrupteur marche/arrêt), tandis que l'HIOMT limite l'amplitude de la réponse (régulateur d'intensité).

### III. Régulation transcriptionnelle de l'*Aa-nat* chez les rongeurs

Chez les rongeurs (par opposition aux ongulés et primates), la synthèse de mélatonine est caractérisée par une très forte régulation transcriptionnelle de l'*Aa-nat*, dont l'expression est augmentée de 100 à 150 fois suite à la stimulation noradrénergique. En cela, la glande pinéale constitue un bon modèle pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes suite à l'action d'un neurotransmetteur. Cependant, la NA n'induit pas seulement une augmentation de l'expression de l'*Aa-nat*, mais également une activation ou une inhibition de nombreux autres gènes (Fukuhara *et al.*, 2003; Humphries *et al.*, 2002). Bien qu'une très grande proportion de ces gènes interviennent dans le métabolisme général de la glande pinéale, d'autres codent des facteurs de transcription pouvant intervenir dans le contrôle transcriptionnel de l'*Aa-nat*. Une analyse récente des interactions protéines/ADN dans la glande pinéale de rat révèle une grande diversité dans l'activité des séquences promotrice dont la moitié présente des variations journalières, avec soit une activation soit une inhibition (Davies & Carter, 2006). Cependant, bien que l'implication directe de certains de ces facteurs de transcription dans la régulation de la transcription de l'*Aa-nat* soit clairement démontrée aujourd'hui, pour d'autres, cette implication et surtout les interactions existant entre eux restent encore obscures.

Le but de cette partie n'est pas de faire un catalogue de tous les facteurs de transcription existant, mais uniquement de s'intéresser à ceux qui ont été les plus étudiés dans la glande pinéale et pour lesquels un rôle probable a été décrit dans la régulation de la transcription de l'*Aa-nat* (CREB, CREM, le complexe AP 1, les produits des gènes horloges). Nous verrons également en quoi leur profil temporel d'expression et les relations de phase existant entre eux sont importants dans l'établissement du rythme d'expression de l'*Aa-nat*.

#### A. Facteurs de transcription et complexe d'initiation

L'expression de la plupart des gènes est régulée par des facteurs de transcription se liant sur les séquences promotrices de l'ADN, en amont du site d'initiation. Leur importance est soutenue par le fait qu'environ 5% du génome humain code ces facteurs, qui pour beaucoup ont encore un rôle inconnu (Tupler *et al.*, 2001). Ils constituent les régulateurs principaux du fonctionnement des cellules. Leur complexité d'action est assurée par le fait qu'ils n'agissent jamais seuls, mais s'associent en complexes activant ou réprimant la transcription des gènes

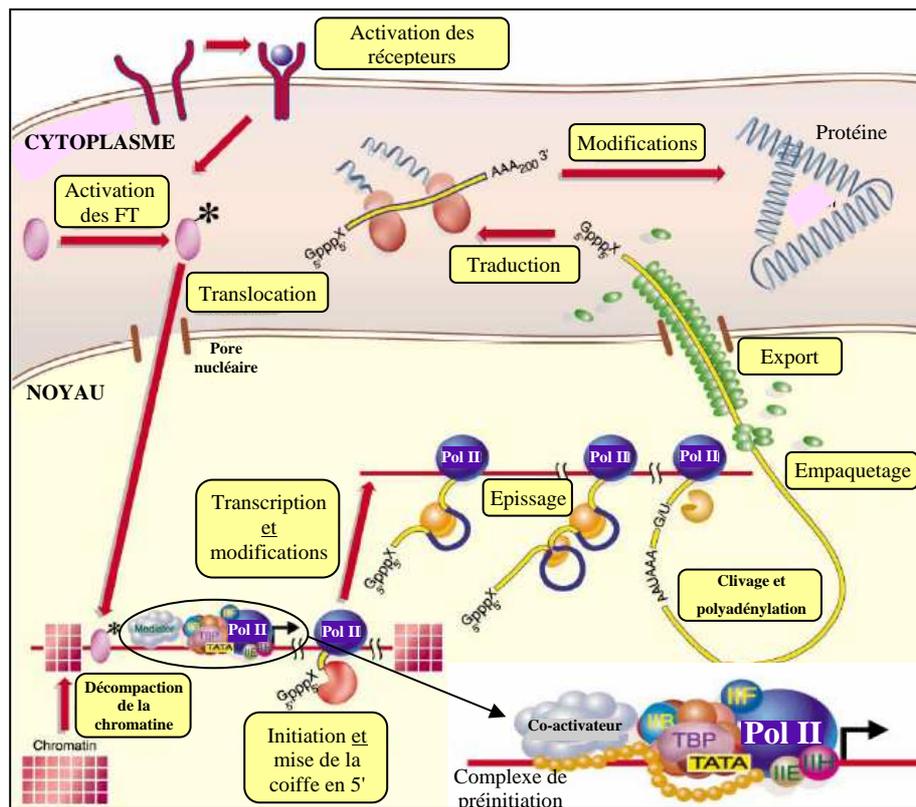
### III. Régulation transcriptionnelle de l'Aa-nat chez les rongeurs

d'une manière plus ou moins spécifique. Ainsi, un même facteur peut avoir deux rôles distincts selon le partenaire avec lequel il s'associe (Herdegen & Leah, 1998 pour revue).

L'activation des récepteurs membranaires aboutit dans un premier temps à la formation de messagers secondaires (AMPc,  $Ca^{2+}$ , etc) qui activent ou inhibent des protéines kinases régulant les facteurs de transcription. Ces derniers sont de deux types : 1) les facteurs de transcription constitutifs qui sont exprimés de façon constitutive dans les cellules et sont généralement activés par phosphorylation et 2) les facteurs de transcription inductibles qui doivent être synthétisés (ARNm et protéine), puis activés avant de se lier à l'ADN et d'exercer leur action (Herdegen & Leah, 1998).

L'activation d'un facteur de transcription génère une augmentation de l'affinité de celui-ci pour les séquences promotrices des gènes, une facilité d'association avec d'autres facteurs de transcription et/ou une activation de la machinerie transcriptionnelle (*trans*-activation). L'activation de la transcription est possible grâce au domaine de *trans*-activation comprenant le site d'activation. Cependant, certains facteurs de transcription ne possèdent pas de domaine de *trans*-activation et agissent donc comme des répresseurs, en empêchant d'autres facteurs de transcription de se fixer sur les sites promoteurs. De plus, chaque facteur possédant une affinité différente pour l'ADN, un facteur de transcription ayant une faible affinité pour l'ADN peut séquestrer un facteur de transcription ayant une forte affinité, diminuant ainsi le potentiel *trans*-activateur de ce dernier (Herdegen & Leah, 1998). La répression ou l'arrêt de la transcription peut également venir d'une diminution de l'expression des facteurs de transcription par diminution de leur synthèse et/ou dégradation, d'une désactivation, ou encore de la dissociation des dimères.

La spécificité de la transcription d'un gène particulier dépend donc non seulement des séquences spécifiques contenues dans son promoteur, qui vont caractériser les protéines capables d'agir sur celui-ci, mais également d'un jeu d'activation et de répression variant en fonction des dimères de facteurs de transcription présents et de leur affinité pour l'ADN. Pour complexifier encore ce schéma, certains facteurs de transcription ne se contentent pas de se fixer sur des séquences d'ADN spécifiques, mais peuvent se fixer sur d'autres éléments dont la séquence est proche, aboutissant ainsi non seulement à une compétition pour la dimérisation, mais également pour les sites de fixation (exemple de CREB et des facteurs AP-1, Herdegen & Leah, 1998, voir **sections III.C et III.D**). De plus, l'aspect temporel de l'expression de ces divers facteurs de transcription apparaît essentiel dans la régulation temporelle de l'expression d'un gène.



**Figure 18 : Représentation schématique des évènements cellulaires à la base de la transcription des gènes dans les cellules eucaryotes.** (d'après Orphanides & Reinberg, 2002)

L'initiation de la transcription et l'élongation des ARNm des gènes codant des protéines chez les eucaryotes sont assurées par l'ARN polymérase II (Pol II, Orphanides & Reinberg, 2002). Bien que celle-ci soit absolument nécessaire à la synthèse des ARNm, elle est incapable d'initier la transcription. Son action nécessite la formation d'un complexe de préinitiation composé de facteurs de transcription généraux, nommés "Transcription Factor II" (TFII), et d'enzymes modifiant la structure de la chromatine (Orphanides & Reinberg, 2002; Woychik & Hampsey, 2002). Ce complexe protéique multimérique se lie au site d'initiation (la boîte TATA) *via* la protéine TBP ("TATA Binding Protein") et permet le recrutement de la Pol II (**figure 18**). Dans ce système, les facteurs de transcription constitutifs et inducibles assurent la formation du complexe de préinitiation et sa fixation sur le site d'initiation *via* l'interaction des facteurs de transcription généraux avec le domaine de *trans*-activation. Cependant, ils n'interagissent pas tous directement avec les facteurs de transcription généraux : certains recrutent des co-activateurs faisant le lien entre les deux (exemple de CREB et CBP, Herdegen & Leah, 1998; Orphanides & Reinberg, 2002; Woychik & Hampsey, 2002, voir **section III.C**). De plus, certains de ces co-activateurs possèdent une activité enzymatique

permettant la compaction/décompaction de l'ADN pour réguler l'accès aux promoteurs (Orphanides & Reinberg, 2002; Richards & Elgin, 2002), assurant ainsi la liaison du complexe de préinitiation à l'ADN, et donc l'action de la Pol II, c'est à dire l'initiation de la transcription et l'élongation de l'ARNm (**figure 18**).

Le rôle des facteurs de transcription est primordial dans l'équilibre activation/répression de la transcription suite à l'activation de voies de signalisations spécifiques. L'aspect temporel de l'expression d'un gène dépend alors étroitement des séquences régulatrices contenues dans son promoteur, mais également des relations temporelles existant entre l'expression des différents facteurs de transcription se liant sur ces séquences. L'expression rythmique de l'ARNm de l'*Aa-nat* suite à la stimulation noradrénergique ne déroge pas à ces règles. L'analyse du promoteur de l'*Aa-nat* ainsi que des relations temporelles existant entre les différents facteurs de transcription correspondant ont permis de définir l'enchaînement des événements transcriptionnels à la base de la genèse de ce rythme.

#### **B. Le promoteur de l'*Aa-nat***

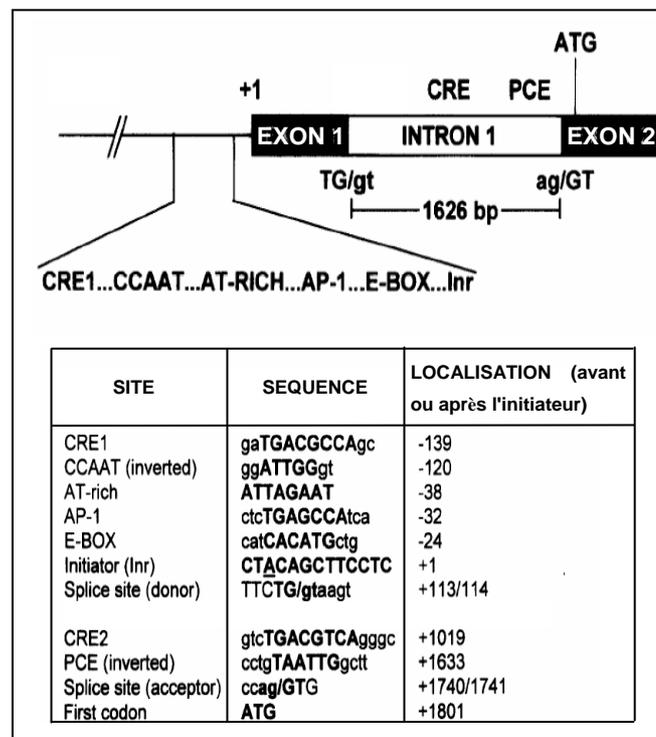
Le promoteur de l'*Aa-nat* a une taille de 2160 paires de bases (pb). Les 200 pb en amont du site d'initiation sont les plus importantes car elles sont nécessaires et suffisantes à l'induction du gène de l'*Aa-nat* (Baler *et al.*, 1997; Baler *et al.*, 1999). Du plus éloigné au plus proche du site d'initiation, on trouve ainsi un site CRE ("cAMP Responsive Element") liant les facteurs de réponses à l'AMPc (CREB, CREM), une boîte CCAAT inversée liant divers facteur de transcription dont NF-Y, une région riche en G et C liant les facteur de transcription Sp1 et AP-2, une région riche en A et T ressemblant à une boîte TATA et servant de site de fixation pour la protéine TBP, une séquence TRE ("Tetradecanoylphorbol-13-acétate Responsive element") liant les facteurs AP-1, et enfin une E-box (**figure 19**, Baler *et al.*, 1997; Baler *et al.*, 1999). Le promoteur contient également des séquences PIRE ("Pineal Responsive Element") liant la protéine CRX ("Cone Rod Homeobox"), qui assurerait la restriction tissulaire de l'expression de l'*Aa-nat* (Li *et al.*, 1998).

En plus de ce promoteur distal, le premier intron (environ 1600 pb) du gène contient également de nombreux sites régulateurs et compose ainsi un "enhancer", c'est-à-dire une association de séquences régulatrices non-nécessaires à l'induction d'un gène mais assurant une potentialisation de l'induction et/ou la spécificité tissulaire et cellulaire de l'expression de

### III. Régulation transcriptionnelle de l'Aa-nat chez les rongeurs

ce gène. Cet "enhancer" contient plusieurs sites CRE, deux E-box, plusieurs séquences PIRE ainsi qu'un site PCE ("Photoreceptor Constitutive Element"). Les séquences CRE assureraient une potentialisation de l'expression, alors que les E-box, les sites PIRE et PCE agiraient en synergie afin de restreindre l'expression à la glande pinéale (Baler *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 1999; Chen & Baler, 2000; Humphries *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces séquences régule strictement l'expression de l'Aa-nat, chaque séquence étant plus ou moins essentielle dans cette régulation. En termes d'induction du gène, l'importance des séquences CRE, AP-1 et PIRE, ainsi que des facteurs de transcription associés ont été les plus étudiées. Nous verrons par la suite le rôle de ces différents facteurs ainsi que leur importance dans la régulation temporelle de l'expression de l'Aa-nat.



**Figure 19 : Composition en séquences régulatrices du promoteur de l'Aa-nat de rat.** Le promoteur est constitué de deux parties : une première située en amont du site d'initiation et une deuxième située dans le premier intron. Les séquences et la localisation (en nombre de nucléotides) par rapport au site d'initiation des sites de régulation sont données dans le tableau. La séquence intronique n'est pas absolument nécessaire à l'induction de la transcription de l'Aa-nat, mais constitue un "enhancer" permettant d'augmenter l'induction et d'assurer la spécificité tissulaire de l'expression. (d'après Baler *et al.*, 1999)

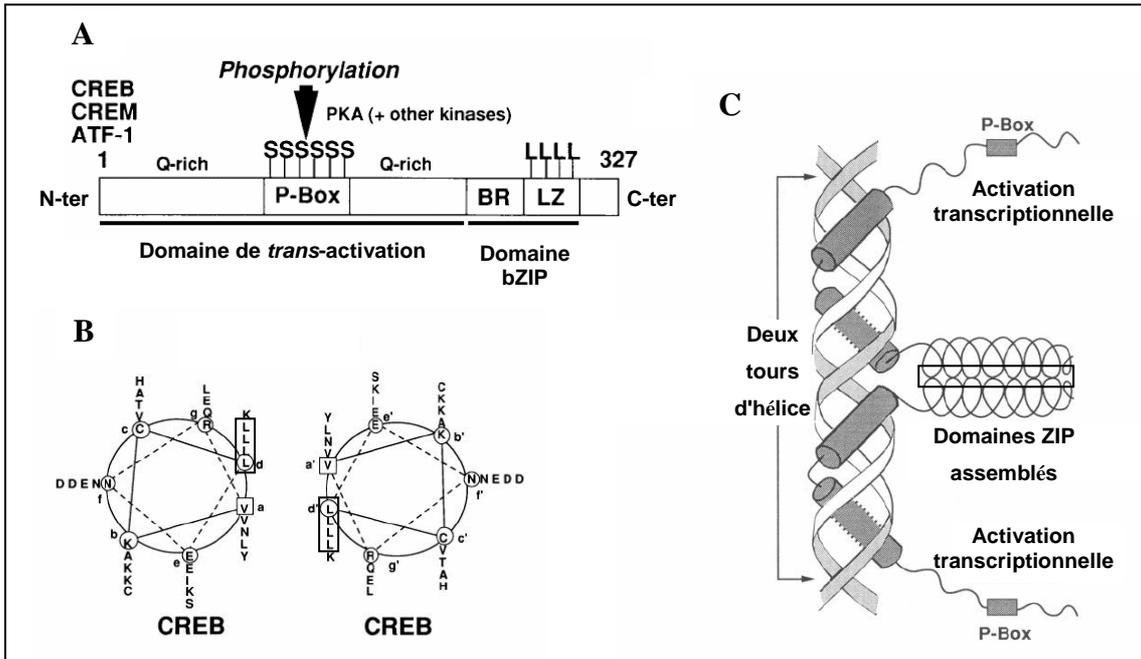
#### C. Facteurs de réponse à l'AMPc : régulation de l'*Aa-nat* par les sites CRE

L'AMPc stimule l'expression des gènes *via* l'activation de facteurs de transcription se fixant sur les séquences promotrices palindromiques CRE ("cAMP Responsive Element", TGACGTCA) et les séquences ne différant que d'une ou deux bases. La sensibilité des gènes à l'AMPc dépend du nombre de séquences CRE contenues dans le promoteur et de leur position par rapport à la boîte TATA : plus il y a de séquences CRE proches de la boîte TATA, et plus le gène sera sensible (Herdegen & Leah, 1998; Montminy, 1997, pour revues). Les protéines activées par l'AMPc appartiennent aux familles CREB ("cAMP Responsive Element Binding proteins"), CREM ("CRE Modulators") et ATF-1 ("Activating Transcription Factor 1"). Leur activité dépend de leur activation par la PKA, mais également par les MAPK et les Ca/CaMK (Herdegen & Leah, 1998; Montminy, 1997).

Ces facteurs de transcription ont un rôle majeur dans la plupart des processus neuroendocrines, plus particulièrement dans la glande pinéale, où l'induction nocturne du gène *Aa-nat* est régulée essentiellement par l'augmentation d'AMPc induite par la stimulation adrénergique (voir **section II**). De plus, le promoteur distal de l'*Aa-nat* contient une séquence ressemblant à CRE (TGACGCCA) dont la mutation entraîne une diminution de l'induction de 60 à 80% suite à une stimulation noradrénergique (Baler *et al.*, 1997). Le premier intron contient également une séquence CRE consensus et deux séquences ressemblant à CRE assurant une potentialisation de l'induction (Baler *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 1999).

##### 1. Une structure commune

Les facteurs de transcription assurant la réponse à l'AMPc ont une structure très similaire et appartiennent à la famille des protéines à domaine bZIP ("basic Leucine zipper"). Ils sont caractérisés par la présence d'un large domaine de *trans*-activation à l'extrémité N-terminale, suivi du domaine bZIP à l'extrémité C-terminale (**figure 20A**, Meyer & Habener, 1993). Ce dernier, très caractéristique, permet à la fois les interactions des protéines entre elles et avec l'ADN. La liaison à l'ADN est assurée par une région riche en acides aminés basiques (**figure 20C**). La dimérisation des partenaires de cette famille est assurée par un domaine riche en Leucine : une tous les 7 résidus sur 4 à 8 tours d'hélice  $\alpha$  (**figure 20B**). Cette configuration précise permet la dimérisation des facteurs de transcription *via* la formation d'une "fermeture éclair" ("zipper") (Landschulz *et al.*, 1988). Ce domaine n'est pas exclusif des protéines CREB/CREM/ATF-1, mais est également présent dans la famille AP-1, permettant des interactions complexes entre différentes sous-familles (Herdegen & Leah, 1998).



**Figure 20 : Structure générale des protéines à domaines bZIP.** (A) Représentation générale des domaines fonctionnels composant les facteurs de transcription de la famille CREB/CREM/ATF-1. Le domaine permettant la liaison à l'ADN (bZIP) se trouve à l'extrémité C-terminale de la protéine. Il contient une région riche en acides aminés basiques (BR) impliquée dans la reconnaissance de l'ADN et un domaine riche en Leucine constituant le "Leucine Zipper" (LZ) et assurant la dimérisation des facteurs de transcription. Le domaine de *trans*-activation se trouve à l'extrémité N-terminale de la protéine. Il est composé de deux régions riches en Glycine (Q-rich) et d'un domaine de phosphorylation (P-Box) riche en Sérines (S) assurant la régulation du facteur de transcription par la PKA et d'autres kinases. (B) Schéma des tours d'hélices du domaine LZ d'un dimère CREB-CREB. Les deux protéines se placent en antisens. La superposition des Leucine (L) est encadrée. (C) Schématisation de la fixation d'un dimère de protéines bZIP à l'ADN. L'hélice distale s'enroule autour de l'ADN. Le domaine LZ est ici perpendiculaire à l'ADN et le domaine de *trans*-activation s'écarte de l'ADN pour pouvoir interagir avec d'autres protéines de la machinerie transcriptionnelle. (d'après Meyer & Habener, 1993)

## 2. CREB : un élément activateur

### a) Induction de la transcription

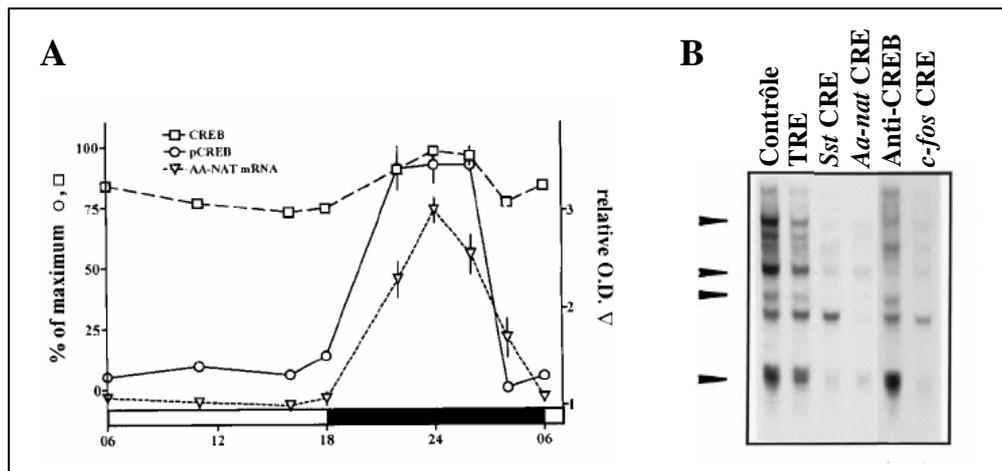
CREB est le premier facteur à domaine bZIP à avoir été caractérisé (Montminy & Bilezikjian, 1987). CREB est une protéine ubiquitaire de 43 kD dont l'expression constitutive et exclusivement nucléaire est assurée par la présence de trois sites de liaison au facteur de transcription Sp1 dans le promoteur, une traduction continue et une séquence permettant la translocation continue dans le noyau (Gonzalez & Montminy, 1989; Meyer & Habener, 1993;

Waeber & Habener, 1991). Deux isoformes de 327 et 341 acides aminés coexistent, les deux ayant la même activité de fixation à l'ADN et d'initiation de la transcription (Berkowitz & Gilman, 1990). La protéine CREB contient un large domaine de *trans*-activation et une région bZIP (**figure 20A**). L'activation de CREB par l'AMPc est principalement conduite par la PKA, dont les sous-unités catalytiques transloquent dans le noyau (Hagiwara *et al.*, 1993; Meinkoth *et al.*, 1993). Celle-ci phosphoryle CREB sur la sérine 133 (<sup>133</sup>Ser) de la P-Box (domaine de phosphorylation riche en sérines), ce qui permet d'activer la *trans*-activation (Hoeffler & Habener, 1990; Lamph *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990; Montminy & Bilezikjian, 1987; Montminy *et al.*, 1990a; Montminy *et al.*, 1990b; Yamamoto *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1990). CREB peut également être activé par les MAPK et par le Ca<sup>2+</sup>, *via* l'activation des Ca/CaMK (Herdegen & Leah, 1998; Meyer & Habener, 1993; Montminy, 1997).

CREB est continuellement lié aux séquences CRE sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec d'autres protéines bZIP. Son activation par la PKA induit non seulement la *trans*-activation, mais augmente également l'affinité des dimères sur les sites CRE à faible affinité (Nichols *et al.*, 1992). L'activation de CREB par la phosphorylation de la <sup>133</sup>Ser permet tout d'abord l'interaction directe de CREB avec le co-activateur CBP *via* la P-box (Chrivia *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1996). CBP interagit ensuite avec TFIIB pour permettre le recrutement de la Pol II (Kee *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 1997). La phosphorylation favorise également l'interaction indirecte des domaines riches en glycines de CREB avec TFIID (Nakajima *et al.*, 1997). L'association entre CREB et CBP permet également des modifications de la chromatine, car CBP peut acétyler les histones (voir **section III.G**, Goldman *et al.*, 1997; McManus & Hendzel, 2001). Cependant, il semblerait que d'autres sites de phosphorylation soient également importants. En effet, la phosphorylation de la <sup>142</sup>Ser active également CREB (Gau *et al.*, 2002), mais la mutation de ce résidu, bien que diminuant fortement les propriétés de *trans*-activation de CREB, ne modifie pas l'interaction entre CREB et CBP (Sun & Maurer, 1995).

#### b) CREB et synthèse de mélatonine

L'expression de CREB est constitutive dans la glande pinéale de rat (**figure 21**, Maronde *et al.*, 1999b; Maronde *et al.*, 1999c; Roseboom & Klein, 1995). *In vivo* et *in vitro*, il est continuellement lié aux séquences CRE, et la NA n'altère pas cette liaison (Roseboom & Klein, 1995). L'utilisation de la technique d' "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) a montré que CREB était le facteur majeur liant les séquences CRE dans la glande pinéale.



**Figure 21 : Profils d'expression et d'activation de CREB dans la glande pinéale de rat. (A)** CREB est exprimé constitutivement dans la glande pinéale de rat. Sa phosphorylation en pCREB est rapide et prolongée. Il est rapidement déphosphorylé en fin de nuit, en parallèle de la diminution de l'expression de l'ARNm de l'Aa-nat. **(B)** CREB se fixe sur les séquences CRE des promoteurs des gènes, dont celui de l'Aa-nat. Des homogénats cellulaires de glande pinéale ont été incubés avec des oligonucléotides mimant la séquence CRE marqués avec des atomes radioactifs (contrôle), puis mis en présence soit d'un excès de divers oligonucléotides de séquences correspondant aux séquences CRE de divers gènes (*sst*CRE, *Aa-nat*CRE et *c-fos*CRE) ou TRE, soit d'anticorps anti-CREB. La diminution de radioactivité correspondant à la compétition entre les divers oligonucléotides est ensuite visualisée. Les diverses séquences CRE utilisées ici déplacent la liaison entre des facteurs de transcription présents dans les homogénats et les séquences CRE radioactives. Ce facteur de transcription est certainement CREB car la liaison est également fortement réduite suite à l'ajout d'anticorps anti-CREB. Cependant, les séquences TRE déplacent également la liaison, suggérant que les facteurs spécifiques de ces séquences se lient sur les CRE ou que CREB se lie sur les TRE. [d'après Maronde *et al.*, 1999 (A) et Baler *et al.*, 1997 (B)]

Cependant, cette technique a également révélé un déplacement de la liaison des facteurs se liant aux séquences CRE par l'ajout de séquences TRE dans les homogénats, démontrant que soit les facteurs spécifiques de cette séquence se fixent également sur les sites CRE, soit que CREB se fixe sur les séquences TRE (Baler *et al.*, 1999). En effet, CREB, associé à CREM, se lie sur les sites TRE (Masquillier & Sassone-Corsi, 1992) et c-FOS et c-JUN, deux protéines AP-1, lient les sites CRE, mais sans se dimériser directement avec CREB ou CREM (Hoeffler *et al.*, 1989; Sassone-Corsi *et al.*, 1990).

*In vitro*, l'activation de CREB sur la <sup>133</sup>Ser est rapide (dès 5 minutes) et maximale 30 à 45 minutes après la stimulation noradrénergique (Maronde *et al.*, 1999b; Maronde *et al.*, 1997b; Maronde *et al.*, 1999c; Roseboom & Klein, 1995; Spessert *et al.*, 2000; Tamotsu *et al.*, 1995).

### III. Régulation transcriptionnelle de l'Aa-nat chez les rongeurs

L'activation de CREB est directement dépendante de la stimulation  $\beta$ -adrénergique : elle est mimée par le dbcAMP et l'isoprotérénol et inhibée par le propranolol (Roseboom & Klein, 1995; Spessert *et al.*, 2000; Tamotsu *et al.*, 1995). La stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques induit plus spécifiquement l'activation de la PKA de type II qui transloque dans le noyau pour phosphoryler CREB. L'inhibition de celle-ci diminue la phosphorylation et la liaison de CREB sur les séquences CRE (Maronde *et al.*, 1997a; Maronde *et al.*, 1997b; Maronde *et al.*, 1999c; Roseboom & Klein, 1995). La stimulation  $\alpha$ -adrénergique n'a d'effet ni sur l'induction directe de pCREB, ni sur la potentialisation de cette induction par la voie  $\beta$ -adrénergique. Cependant, l'application de chlorure de potassium ou d'ouabaine augmente la phosphorylation de CREB dans les pinéaloctes, démontrant ainsi un rôle du  $Ca^{2+}$  dans l'induction de pCREB, mais passant par une autre voie que l'activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques (Roseboom & Klein, 1995). L'induction de pCREB dans la glande pinéale est très sensible car nécessite environ cent fois moins de NA que la stimulation de l'Aa-nat ou de la mélatonine (Stehle *et al.*, 2001).

*In vivo*, l'induction de pCREB est rapide, précède celle de l'Aa-nat en début de nuit (**figure 21**), et est prolongée jusqu'en milieu de nuit (Maronde *et al.*, 1999a; von Gall *et al.*, 2000a), traduisant les besoins d'une quantité continue pendant toute la période d'activation nécessaire à l'expression prolongée des gènes induits par l'AMPC (Baker *et al.*, 2004). L'importance du rôle de pCREB dans l'induction de l'ARNm de l'Aa-nat est soutenue par le fait que la cycloheximide appliquée en début de nuit n'a aucun effet sur cette induction, démontrant bien l'implication d'un facteur de transcription constitutif (Roseboom *et al.*, 1996). En fin de nuit, l'expression de pCREB diminue fortement, en parallèle de celle de l'Aa-nat et de la libération de NA (Drijfhout *et al.*, 1996a; Drijfhout *et al.*, 1996b; Maronde *et al.*, 1999a). Cette diminution de l'expression de pCREB est principalement conduite par l'arrêt de la libération de la NA, mais également par l'activation de phosphatases, transloquant dans le noyau suite à la stimulation noradrénergique, et déphosphorylant CREB (Koch *et al.*, 2003). Ce mécanisme participe directement à la diminution de l'expression de l'Aa-nat en fin de nuit. En effet, l'ajout d'inhibiteurs de ces phosphatases à des pinéaloctes en cultures stimulés à la NA prolonge non seulement l'expression de pCREB suite au retrait de la NA du milieu de culture, mais également celle de l'Aa-nat (Koch *et al.*, 2003). Ce mécanisme permet donc de diminuer l'expression de pCREB en fin de nuit et agit en complément de la diminution d'AMPC suite à l'arrêt de la libération de NA et de l'augmentation d'expression des phosphodiesterases (voir **section II.D.2**).

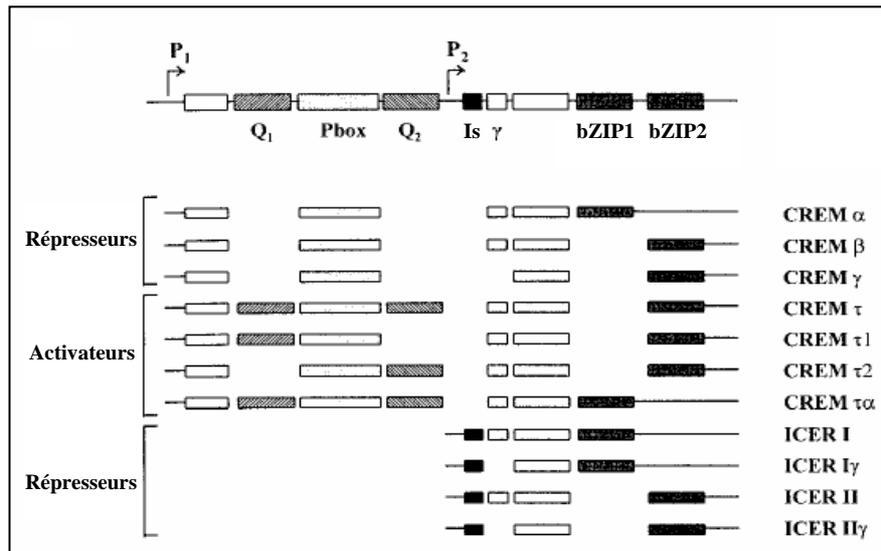
La régulation du profil d'expression de pCREB dans la glande pinéale par la NA semble primordiale à l'expression rythmique de l'Aa-nat. Son activation/inactivation rapide permet l'initiation rapide et la terminaison de la transcription de l'Aa-nat. Cependant, d'autres facteurs de transcription de la famille des protéines à domaines bZIP semblent participer à l'établissement de ce rythme, notamment les protéines de la famille CREM.

### 3. CREM : un modulateur de CREB

#### a) Les protéines CREM

Les protéines CREM sont exprimées constitutivement et sont structurellement très proches de CREB, bien que dérivant d'un gène différent (Meyer & Habener, 1993; Sassone-Corsi, 1995; Sassone-Corsi, 1998). Elles se distinguent de CREB par le codage de deux domaines bZIP, ayant des affinités différentes pour l'ADN (Foulkes *et al.*, 1991a). Les différentes isoformes, dérivant de l'épissage alternatif du même gène très conservé entre les espèces, ont des activités différentes en fonction des domaines exprimés (**figure 22**; Foulkes *et al.*, 1991a; Laoide *et al.*, 1993; Sassone-Corsi, 1998). Ainsi, les isoformes CREM $\tau$ , possédant un ou deux domaines riches en glycine (Q-rich), sont des activateurs, alors que les isoformes CREM $\alpha/\beta/\gamma$ , en étant dépourvues, sont des répresseurs (Delmas *et al.*, 1992; Foulkes *et al.*, 1991a; Foulkes *et al.*, 1991b). Toutes les isoformes (excepté ICER) possèdent le domaine P-Box, qui semble remplir une fonction différente suivant l'isoforme. Comme pour CREB, la P-Box est phosphorylée par la PKA, aboutissant soit à l'activation des isoformes activatrices, soit à l'inhibition des répresseurs (Foulkes *et al.*, 1991b; Laoide *et al.*, 1993; Sassone-Corsi, 1995; Sassone-Corsi, 1998). Les différentes protéines CREM dimérisent entre elles et avec CREB *via* le domaine bZIP, aboutissant donc soit à une activation soit à une inhibition de la transcription par blocage des sites de liaison ou par inhibition des propriétés de *trans*-activation de CREB.

Au sein de cette famille, une protéine a plus particulièrement attiré l'attention : ICER ("Inducible cAMP Early Repressor"). ICER est une petite protéine d'environ 15 kD exprimée sous la forme de 4 isoformes ayant des propriétés de liaison à l'ADN identiques (Burkart *et al.*, 2006; Stehle *et al.*, 1993) et se distinguant essentiellement par le domaine bZIP exprimé et la présence ou non d'un exon  $\gamma$  supplémentaire (**figure 22**). Elles dérivent de la transcription du gène *CREM* à partir d'un promoteur alternatif (P2) situé après les exons codant le domaine de *trans*-activation (**figure 22**, Delmas *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1993).



**Figure 22 : Structure du gène *CREM* et des diverses isoformes traduites.** Le gène *CREM* contient deux promoteurs : le premier (P1) permet la synthèse des protéines CREM et le deuxième (P2) conduit spécifiquement la synthèse de protéines ICER. Par un mécanisme d'épissage alternatif des ARNm, plusieurs isoformes découlent de la traduction, se distinguant l'une de l'autre par les domaines exprimés. Les isoformes ne contenant pas les domaines riches en glycine (Q1 et Q2) agissent comme des répresseurs car elles n'ont pas de propriétés de *trans*-activation. Les autres isoformes contenant soit Q1, soit Q2, soit les deux sont activatrices. Les 4 isoformes ICER se distinguent par l'absence totale du domaine de *trans*-activation (région Q et P-box), et sont donc également des répresseurs. Elles possèdent aussi une région supplémentaire spécifique de ces protéines (Is). Le gène *CREM* est particulier car il code deux domaines bZIP différents, chaque protéine exprimant l'un des deux. (d'après *Uyttersproot et al., 1999*)

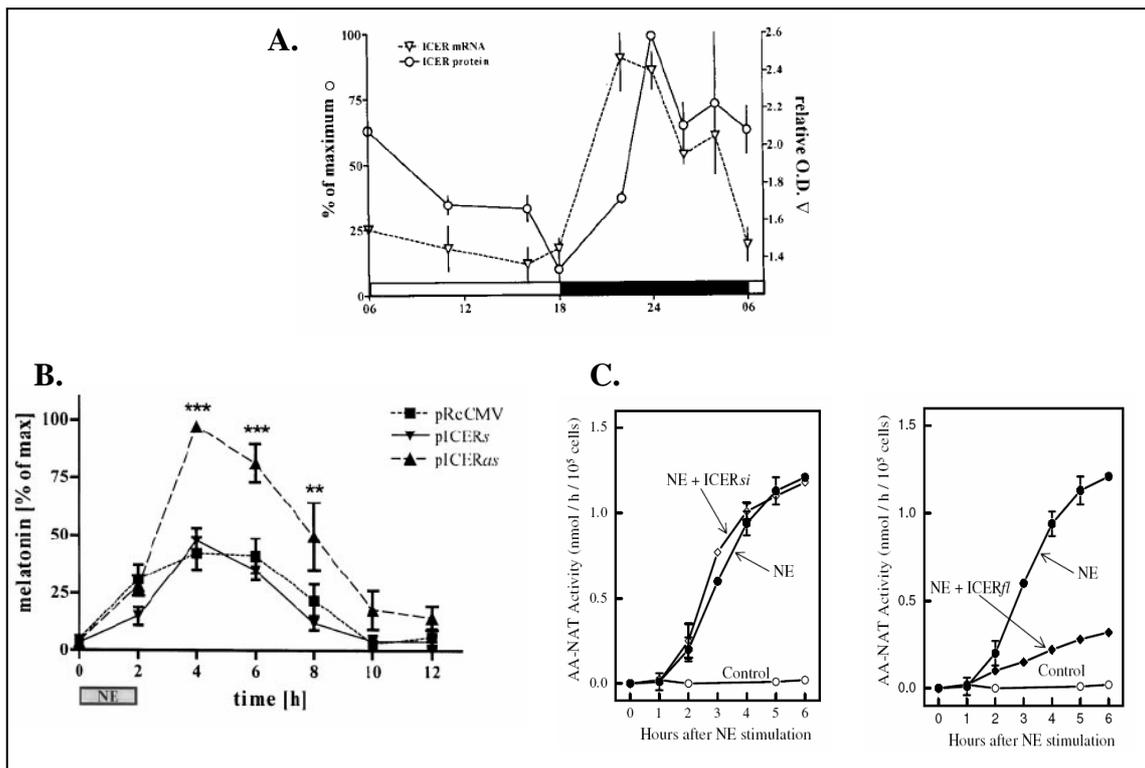
L'absence de domaines de *trans*-activation et de phosphorylation fait de cette protéine un répresseur des gènes induits par l'AMPc, dont l'activité ne dépend que de la quantité exprimée.

ICER forme des homodimères ou des hétérodimères avec CREB et les autres protéines CREM, réprimant ainsi la transcription soit par occupation des sites CRE, soit par séquestration de CREB et des protéines CREM activatrices. Son pouvoir répresseur est très fort car il inhibe la transcription induite par pCREB à des doses sub-stoechiométriques (Foulkes *et al.*, 1996a). Il constitue une exception dans la famille CREB/CREM/ATF, car son expression n'est pas constitutive. En effet, la présence de 4 sites CRE dans le promoteur P2 du gène *CREM* rend son expression uniquement dépendante de l'activation de CREB par l'AMPc (Lamas *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1993; Stehle *et al.*, 1993). Cette induction tardive par rapport à l'activation de pCREB et son affinité forte pour les séquences CRE en ferait un

acteur principal dans la nature transitoire de l'induction des gènes dépendants de l'AMPC, y compris lui-même (Foulkes *et al.*, 1996a; Lalli *et al.*, 1996; Lamas & Sassone-Corsi, 1997; Sassone-Corsi, 1998). Ainsi, le rapport temporel existant entre l'expression de pCREB et ICER serait le principal paramètre régulant l'induction des gènes dépendant de l'AMPC : le ratio en début de stimulation serait en faveur de l'activation par pCREB, alors que celui en fin de stimulation serait en faveur d'ICER et résulterait en une inhibition de la transcription.

#### b) ICER réprime l'expression de l'*Aa-nat* ?

ICER est un facteur de transcription important dans la régulation de nombreux processus neuroendocrines et cérébraux (Mioduszezewska *et al.*, 2003; Sassone-Corsi, 1998; Stehle *et al.*, 2001). Son importance dans la glande pinéale de rat a été suggérée suite à sa découverte en tant qu'isoforme majeure de CREM exprimée dans cette structure (Stehle *et al.*, 1993). L'ARNm d'*Icer* est fortement exprimé selon un rythme journalier et circadien, dépendant de la libération de NA, puisque inhibé par une ganglionectomie (Stehle *et al.*, 1993). Son induction dépend majoritairement de la stimulation  $\beta$ -adrénergique car elle est inhibée par le propranolol et stimulée par l'isoprotérénol et les analogues de l'AMPC (Pfeffer *et al.*, 1999; Stehle *et al.*, 1993). L'expression des ARNm augmente rapidement en début de nuit pour devenir maximale en milieu de nuit, puis diminue progressivement jusqu'à un minimum en fin de nuit/début de jour (**figure 23**, Maronde *et al.*, 1999a). L'expression de la protéine chez le rat et la souris suit parfaitement celle de l'ARNm, avec un maximum en fin de nuit/début de jour. Cependant, ICER ayant une demi-vie relativement longue, les niveaux restent élevés durant le jour et redeviennent minimaux en début de nuit suivante (**figure 23**, Maronde *et al.*, 1999a; von Gall *et al.*, 2000b). La liaison d'ICER sur le promoteur de l'*Aa-nat* est spécifique des sites CRE, où il exerce une forte inhibition de la transcription. En effet la transfection de pinéalocytes avec ICER inhibe la fixation de pCREB sur les sites CRE, à des concentrations sub-stoechiométriques, démontrant ainsi le fort pouvoir répresseur d'ICER sur la transcription induite par pCREB (Foulkes *et al.*, 1996a). De plus, l'induction de l'ARNm d'*Icer* de jour en LD dans la glande pinéale de rat est réprimée, sans doute à cause de sa forte expression durant cette période (Stehle *et al.*, 1993). L'*Aa-nat* étant massivement régulée par l'AMPC et donc par pCREB, l'ensemble de ces résultats a tout naturellement laissé suggérer qu'ICER serait le principal responsable de la terminaison de la transcription de l'*Aa-nat* en fin de nuit. En effet, en observant les profils d'expression de pCREB et d'ICER, on s'aperçoit que le ratio en début de nuit est en faveur de pCREB, ce qui se traduit par une activation de l'*Aa-nat*. En fin de nuit,



**Figure 23 : Rôle de la protéine ICER dans l'établissement du rythme d'expression de l'Aa-nat.** (A) Profils d'expression de l'ARNm et de la protéine ICER dans la glande pinéale de rat en LD 12:12. (B) Effet de l'inactivation de l'expression d'ICER dans des pinéaloctes en culture sur la synthèse de mélatonine. Les pinéaloctes ont été transfectés avec des oligonucléotides sens (pICERs) et antisens (pICERas) ciblant l'ARNm d'*Icer*, puis stimulés pendant 2 heures avec de la NA. L'expression de la mélatonine est suivie pendant 12 heures. La sous-expression d'ICER ne change pas le profil de sécrétion de la mélatonine mais augmente de deux fois les quantités sécrétées. (C) Effet de la sous-expression et de la sur-expression d'ICER dans des pinéaloctes en culture. Les cellules ont été transfectées avec des adénovirus codant soit des ARN interférents ciblant l'ARNm d'*Icer*, soit la séquence complète d'*Icer* (sur-expression), puis stimulés pendant 6 heures avec de la NA. Contrairement à l'expérience précédente, la sous-expression d'ICER n'a aucun effet sur la synthèse de mélatonine, alors que la sur-expression inhibe fortement celle-ci. (d'après Maronde *et al.*, 1999 (A et B) et Ho *et al.*, 2006 (C))

ce ratio est nettement en faveur d'ICER, ce qui se traduirait en une inhibition de la transcription de l'Aa-nat (Maronde *et al.*, 1999a; von Gall *et al.*, 2000a). De plus, l'inhibition de l'expression d'ICER, *in vivo* chez des souris mutantes pour *CREM* ou *in vitro* par l'utilisation d'oligonucléotides antisens, augmente fortement l'expression de l'Aa-nat (ARNm et protéine) et la sécrétion de mélatonine endogènes et induites par la NA (figure 23, Foulkes *et al.*, 1996a; Maronde *et al.*, 1999a; Pfeffer *et al.*, 2000). Seulement, le déroulement temporel de

l'*Aa-nat* en fin de nuit ou de stimulation est identique, que l'expression d'ICER soit réprimée ou non (**figure 23**), invalidant donc cette hypothèse. De plus, ces résultats ont été infirmés récemment par une étude révélant que la sous-expression d'ICER *in vitro* par des ARN interférants n'avait aucun impact sur l'induction de l'*Aa-nat*, et ce aux même points horaires que dans l'étude précédente (**figure 23**, Ho *et al.*, 2007b). ICER ne serait donc pas responsable de la terminaison de la transcription de l'*Aa-nat*, mais pourrait participer à la diminution du ratio d'induction de cette dernière, en conjonction avec la diminution d'AMPC et la déphosphorylation progressive de CREB, pour limiter les niveaux maximaux atteints.

De ces différentes études, une autre hypothèse a émergé selon laquelle ICER pourrait être responsable des variations photopériodiques de l'amplitude du pic de l'*Aa-nat*. En effet, l'expression du gène *CREM* est corrélée à la longueur de la nuit et résulte en une expression plus longue d'ICER en photopériode courte, avec des niveaux diurnes et en début de nuit plus importants en photopériode courte qu'en photopériode longue. Ainsi, par sa forte expression en début de nuit, ICER pourrait être responsable du délai observé dans l'induction de l'*Aa-nat* en photopériode courte dans la glande pinéale de rat (Foulkes *et al.*, 1996b).

Un dernier rôle a également été proposé dans l'établissement du rythme de l'*Aa-nat* à l'âge adulte. En effet, durant le développement embryonnaire chez le rat, l'*Aa-nat* a une expression constitutive très élevée et ICER n'est pas exprimé (Stehle *et al.*, 1995). A la fin de la première semaine post-natale, le rythme journalier d'ARNm de l'*Aa-nat* se met en place, en parallèle du rythme d'expression d'ICER qui, selon cette hypothèse, serait responsable de l'inhibition diurne de l'expression de l'*Aa-nat*. Cependant, il est important de noter ici que dans les expériences de sous expression d'ICER, l'expression rythmique de l'*Aa-nat* est toujours visible et les niveaux de base ne sont pas augmentés. Ceci suggère que la mise en place du rythme de l'*Aa-nat* dépend essentiellement de la mise en place de l'innervation noradrénergique, générant également le rythme d'ICER.

Enfin ICER pourrait également avoir un impact sur d'autres gènes impliqués dans la synthèse de mélatonine, comme il a été suggéré pour l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Pfeffer *et al.*, 1998).

#### **D. Les protéines du complexe AP-1 : activation ou répression ?**

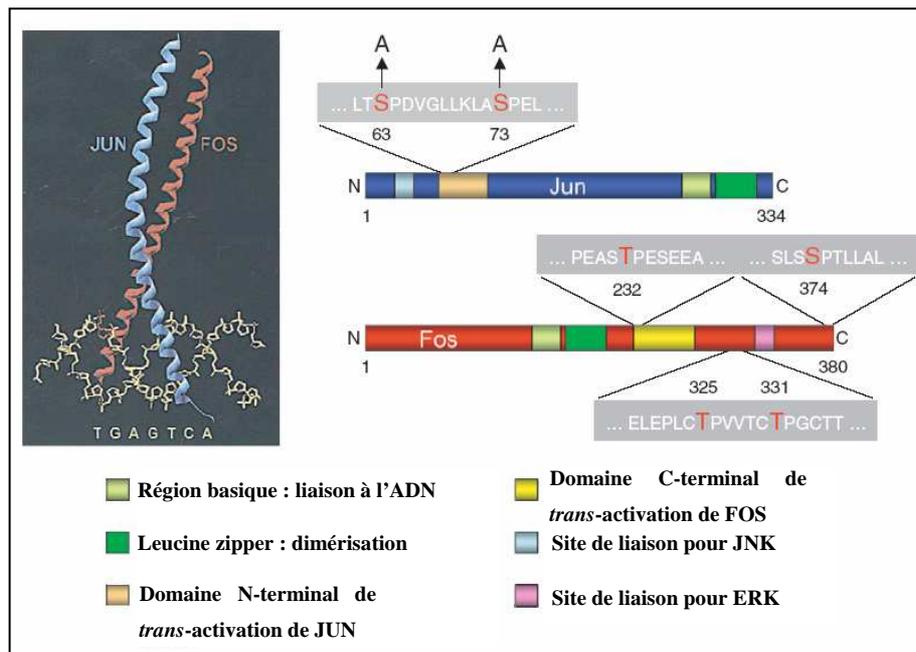
A l'origine, le complexe AP-1 a été décrit comme un ensemble de protéines se liant spécifiquement sur les séquences TRE des promoteurs (Lee *et al.*, 1987). Aujourd'hui, cette

terminologie fait référence à tous les dimères formés au sein des familles JUN et FOS. FOS et JUN sont des protéines dont la taille est comprise entre 300 et 400 acides aminés. La famille FOS comprend 4 membres identifiés chez les mammifères (c-FOS, FOS-B, Fra-1 et Fra-2, pour "FOS Related Antigen") et la famille JUN en compte 3 (c-JUN, JUN-B et JUN-D) (Herdegen & Leah, 1998). Contrairement aux protéines CREB/CREM/ATF, les facteurs AP-1 ne sont pas constitutifs, mais nécessitent d'être synthétisés puis activés. Cette synthèse est très rapide suite à un stimulus, ce qui leur a valu d'être qualifiés de gènes précoces. Ces protéines contiennent un domaine bZIP qui permet leur dimérisation entre eux, mais également avec les autres protéines à domaine bZIP, complexifiant encore leurs possibilités d'action. De plus, la formation des dimères apparaît spécifique du type cellulaire et de l'expression temporelle des différents acteurs. La fonction des protéines FOS et JUN dépend donc du contexte cellulaire dans lequel elles sont présentes (Chinenov & Kerppola, 2001).

#### 1. FOS et JUN : interactions et rôles physiologiques

La grande différence entre les protéines FOS et JUN tient essentiellement dans la position des domaines bZIP et de *trans*-activation. Alors que les protéines JUN sont organisées selon le schéma observé pour CREB/CREM/ATF, avec le domaine de *trans*-activation en N-terminal et le domaine bZIP en C-terminal, les protéines FOS ont une organisation inversée (**figure 24**, Hess *et al.*, 2004). De ce fait, les protéines FOS ne peuvent que s'hétérodimériser avec les protéines JUN, alors que ces dernières peuvent s'homodimériser. De plus, la position centrale du domaine bZIP rend la liaison à l'ADN de FOS possible uniquement suite à l'interaction avec les protéines JUN. Cependant, cette interaction semble nécessaire pour augmenter le pouvoir de liaison à l'ADN et de *trans*-activation des protéines JUN. Par exemple, c-JUN a une forte affinité pour les séquences de l'ADN lorsqu'il s'homodimérise, mais son activité et son affinité sont encore augmentées lorsqu'il s'hétérodimérise avec c-FOS (Halazonetis *et al.*, 1988; Ryseck & Bravo, 1991; Sassone-Corsi *et al.*, 1990). De plus, les protéines JUN-B et JUN-D, ne présentant que peu d'homologie avec c-JUN et ne possédant respectivement que 20% et 60% de son activité, se retrouvent être de forts activateurs transcriptionnels lorsqu'ils sont associés à c-FOS (Hirai *et al.*, 1989; Ryseck & Bravo, 1991).

L'interaction des protéines AP-1 entre elles peut donner lieu à 18 dimères, tous ayant des propriétés de liaison à l'ADN et de *trans*-activation différentes, en faisant soit des activateurs soit des répresseurs (Herdegen & Leah, 1998; Hess *et al.*, 2004; Mechta-Grigoriou *et al.*, 2001). Par exemple, la dimérisation entre Fra2 et JUN-D donne lieu à une forte activation



**Figure 24 : Structure des protéines c-FOS et c-JUN.** La structure des deux protéines est similaire en termes de domaines présents. Toutes deux possèdent une région basique et le domaine Leucine zipper. Le domaine de *trans*-activation contient un site d'ancrage pour des protéines kinases : JNK pour c-JUN et ERK pour c-FOS. Les principaux acides aminés modifiés sont indiqués en rouge et leur position dans la séquence est indiquée. La différence majeure tient dans la position du domaine de *trans*-activation qui se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine pour c-JUN et à l'extrémité C-terminale pour c-FOS. (d'après Hess *et al.*, 2004)

transcriptionnelle (augmentation de 150% de l'activité normale de JUN-D), celle entre Fra2 et c-JUN diminue cette activation (d'environ 30%), et l'interaction entre c-FOS et c-JUN ou JUN-D l'augmente (Suzuki *et al.*, 1991). Ceci démontre bien qu'une seule et même protéine peut avoir deux fonctions selon le partenaire avec lequel elle agit. Le cas de JUN-B est également fort intéressant. Cette protéine a une faible affinité pour l'ADN, ce qui fait que les dimères JUN-B/JUN-B sont généralement inactifs dans l'activation des promoteurs *via* les sites TRE. En se dimérisant avec c-JUN ou JUN-D, JUN-B inhibe le potentiel *trans*-activateur de ces deux protéines essentiellement en diminuant leur affinité pour l'ADN (Deng & Karin, 1993; Mechta-Grigoriou *et al.*, 2001; Metz *et al.*, 1994; Ryseck & Bravo, 1991). Il apparaît donc clairement que les relations temporelles dans la présence de ces différentes protéines définissent un jeu d'activation/inhibition des promoteurs des gènes très précis.

En plus de ces interactions complexes, les dimères AP-1 ne sont pas uniquement spécifiques des séquences TRE, mais ils peuvent également se lier aux sites CRE des

promoteurs, qui ne diffèrent des TRE que d'une seule base (TRE: TGAGTCA; CRE: TGACGTCA). Ainsi, les dimères c-JUN/c-JUN et c-FOS/c-JUN se lient avec la même affinité sur les sites TRE et CRE pour activer la transcription, et leur affinité est même plus forte pour ces dernières que celle de CREB (Ryseck & Bravo, 1991; Sassone-Corsi *et al.*, 1990). Cependant, tous les dimères ne sont pas capables de se fixer sur les sites CRE. De plus, il semblerait que cette fixation soit spécifique de certains gènes, en fonction des séquences régulatrices entourant les sites CRE (Chinenov & Kerppola, 2001; Herdegen & Leah, 1998).

L'activation de la transcription des gènes par le complexe AP-1 est conduite par l'association des différents facteurs de transcription avec le complexe de préinitiation ou des co-activateurs. Par exemple, c-JUN peut s'associer avec CBP et TFIID (Arias *et al.*, 1994; Oehler & Angel, 1992), et c-FOS avec CBP, TFIID et TBP (Metz *et al.*, 1994). Les capacités de *trans*-activation sont augmentées par la phosphorylation du domaine de *trans*-activation essentiellement *via* les MAPK (JNK pour JUN et ERK1/2 pour FOS, **figure 24**), mais également par d'autres kinases comme FRK ("FOS Regulated Kinase") et GSK3 ("Glycogen Synthase Kinase 3") (Herdegen & Leah, 1998; Hess *et al.*, 2004; Karin, 1995). Originellement, ces facteurs de transcription ont été caractérisés comme conduisant les effets de la stimulation de la PKC. Cependant, ils apparaissent aujourd'hui comme un centre de convergence de multiples voies de signalisation (sérum, Ca<sup>2+</sup>, AMPc) et de multiples protéines kinases (Herdegen & Leah, 1998; Sng *et al.*, 2004). De plus, ces voies de signalisation semblent plus ou moins spécifiques en fonction du type cellulaire, rendant une généralisation très difficile. C'est pourquoi je ne décrirai que l'activation étudiée dans la glande pinéale des mammifères.

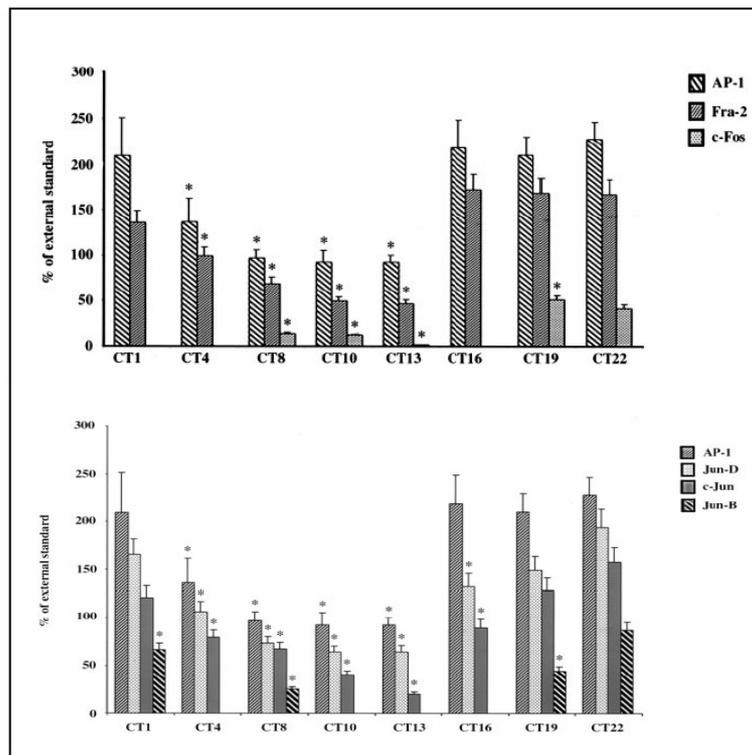
#### 2. AP-1 et transcription de l'Aa-nat

Les facteurs du complexe AP-1 sont exprimés dans la glande pinéale de rat suite à une stimulation noradrénergique. L'expression de c-FOS, c-JUN, JUN-B, JUN-D et Fra-2 a plus particulièrement été étudiée (Baler & Klein, 1995; Carter, 1997). La régulation de cette induction par la stimulation noradrénergique diffère selon le facteur considéré. *In vivo* et *in vitro*, les ARNm de *c-fos* et *jun-B* sont fortement exprimés, de façon rapide et transitoire dès 2 heures après la stimulation noradrénergique (Carter, 1990; Carter, 1992; Carter, 1993a). Leur régulation diffère par le type de récepteur impliqué. *c-fos* est induit massivement par la stimulation  $\alpha$ -adrénergique, alors que *jun-B* est régulé à la fois par les voies  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques. En ce qui concerne l'induction des protéines, les études réalisées *in vitro* sont quelque peu contradictoires, avec soit un faible effet de la stimulation  $\beta$ -adrénergique sur c-

### III. Régulation transcriptionnelle de l'*Aa-nat* chez les rongeurs

FOS, et pas d'induction de la protéine JUN-B par la NA (Chetsawang *et al.*, 2001), soit une nette stimulation de c-FOS par l'AMPc (Tuulivaara & Koistinaho, 1991) ou encore une stimulation de c-FOS et JUN-B suite à la stimulation noradrénergique (Carter, 1994) ou de c-FOS uniquement avec de fortes doses de NA (Baler & Klein, 1995). *In vivo*, la protéine c-FOS a été décrite avec une expression constitutive sur 24h (Baler & Klein, 1995). L'expression de *jun-D* ne varie pas sur 24h, et ne semble pas régulée par la NA car ni les agonistes ni les antagonistes adrénergiques n'altèrent son expression (Carter, 1992). L'expression de *c-jun* est en revanche diminuée en début de nuit suite à la stimulation  $\beta$ -adrénergique *via* une inhibition par la PKA (Carter, 1992). Cependant, ce dernier est stimulé *in vitro* par la stimulation noradrénergique, résultant certainement d'une action antagoniste d'une voie activatrice par la PKC et inhibitrice par la PKA (Carter, 1992; Carter, 1993b). Le dernier de cette longue série, Fra-2, est également induit par la stimulation  $\beta$ -adrénergique, avec un minimum pendant le jour et un maximum en milieu/fin de nuit chez le rat (Baler & Klein, 1995; Engel *et al.*, 2005; Guillaumond *et al.*, 2000).

L'activité de fixation des protéines AP-1 sur les séquences TRE suit un rythme journalier et circadien, avec un maximum en fin de nuit (**figure 25**, Baler & Klein, 1995; Carter, 1994; Guillaumond *et al.*, 2000). Ce rythme est contrôlé par l'horloge, car il disparaît en LL et persiste en DD (Carter, 1994), et est inhibé suite à une exposition à la lumière durant la nuit (Guillaumond *et al.*, 2000). Cependant, l'analyse de la composition du complexe AP-1 par EMSA diverge selon les auteurs. Pour certains JUN-D et JUN-B seraient les composants principaux du complexe, avec JUN-D lié à l'ADN quelque soit l'heure de la journée et JUN-B durant la nuit. c-FOS ne ferait pas partie du complexe, excepté *in vitro* (Carter, 1994). Pour d'autres auteurs, JUN-D, c-JUN et Fra-2 seraient les composants majeurs, et c-FOS et JUN-B ne participeraient que faiblement en fin de nuit (**figure 25**, Guillaumond *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001). Ce profil particulier de fixation à l'ADN a laissé supposer un rôle répresseur du complexe AP-1 dans la transcription de l'*Aa-nat* en fin de nuit. Fra-2 a été décrit comme la protéine majeure conduisant cet effet, essentiellement grâce à son rôle d'inhibiteur décrit dans la littérature et à son profil d'expression qui colle parfaitement avec une inhibition de l'*Aa-nat* en fin de nuit (Baler & Klein, 1995; Guillaumond *et al.*, 2000). Cependant, l'utilisation de dominants négatifs pour Fra-2 chez des rats *in vivo*, ou la sous-expression de Fra-2 *in vitro* ne modifie absolument pas le profil d'expression de l'*Aa-nat*, invalidant donc cette hypothèse (Ho *et al.*, 2007b; Smith *et al.*, 2001). Néanmoins, d'autres gènes semblent affectés, par exemple *Dio2*. En effet, la conséquence des deux expériences précédentes est l'augmentation de



**Figure 25 : Profil temporel de fixation des protéines AP-1 sur les séquences TRE dans la glande pinéale de rat.** La fixation de protéines sur des séquences oligonucléotidiques TRE a été étudiée par la technique d'EMSA. La contribution respective des différents facteurs formant le complexe AP-1 a été évaluée en mesurant la diminution du signal AP-1 spécifique résultant de l'ajout d'anticorps spécifiques. Les protéines Fra-2, c-JUN et JUN-D semblent être les constituants majeurs des complexes AP-1 fixés à l'ADN. (d'après *Guillaumond et al., 2000*).

l'expression de *Dio2* dans la glande pinéale de rat, suggérant donc un rôle inhibiteur de Fra-2 dans la transcription de ce gène. Le rôle du complexe AP-1 dans la régulation du profil rythmique de la transcription de l'*Aa-nat* reste donc encore très obscur. Cependant, l'effet de la mutation du site AP-1 du promoteur de l'*Aa-nat* n'a jamais été étudié. De plus, certains de ces facteurs se fixant également sur les séquences CRE, il serait très instructif d'étudier le profil de fixation de ces différents facteurs de transcription sur ces séquences.

### E. Les produits des gènes horloge

Comme beaucoup d'autres structures centrales et périphériques, la glande pinéale exprime les produits des gènes horloge. Chez le rat et la souris, les ARNm de *Per1/2/3* et *Cry1/2* sont exprimés selon un rythme journalier et circadien, avec un maximum en début/milieu de nuit,

### III. Régulation transcriptionnelle de l'*Aa-nat* chez les rongeurs

de même que ceux de *Bmal1* qui sont maximum durant le jour (Fukuhara *et al.*, 2000; Karolczak *et al.*, 2004; Namihira *et al.*, 1999; Simonneaux *et al.*, 2004; von Gall *et al.*, 2001). Les ARNm de *Clock* sont exprimés selon un rythme journalier avec un maximum en milieu de nuit chez le rat et la souris (Karolczak *et al.*, 2004; Namihira *et al.*, 1999). L'expression des protéines PER1/2 et CRY1/2 est maximale en fin de nuit (Karolczak *et al.*, 2004). En revanche, l'expression des protéines BMAL1 et CLOCK semble constante sur 24 heures, avec un très léger pic durant la nuit.

Au contraire des NSC, où ces protéines oscillent de façon soutenue, le rythme d'expression s'amenuise très rapidement dans des glandes pinéales en culture (Abe *et al.*, 2002; Fukuhara *et al.*, 2005), traduisant très certainement la forte dépendance de l'expression de ces gènes à des signaux extérieurs. L'expression de *Per1* et *Cry2* est en cela tout à fait caractéristique, car elle dépend fortement de la libération de NA. *In vitro* et *in vivo*, la NA et les agonistes  $\beta$ -adrénergiques induisent l'expression de *Per1* et *Cry2* dans la glande pinéale de rat (Simonneaux *et al.*, 2004; Takekida *et al.*, 2000). De même, l'expression de *Per1* est inhibée suite à une ganglionectomie (Takekida *et al.*, 2000). De plus, leur expression est réduite en début de nuit par le propranolol ou une exposition à la lumière (Fukuhara *et al.*, 2000; Simonneaux *et al.*, 2004; Takekida *et al.*, 2000). Ceci suggère que la glande pinéale est un "oscillateur esclave" dont le fonctionnement est synchronisé par les NSC, *via* la NA.

Au regard de leurs profils d'expression, les produits des gènes horloges pourraient jouer un rôle dans l'établissement du rythme de synthèse de la mélatonine par la glande pinéale. Ces protéines appartiennent aux familles de facteurs de transcription à domaines PAS et bHLH : CLOCK et BMAL1 se dimérisent pour activer la transcription *via* les E-box, et PER et CRY se dimérisent pour inhiber leur action (voir **section I**). Ainsi, l'expression de CLOCK/BMAL1 pourrait activer la transcription de l'*Aa-nat* en début de nuit, et PER/CRY inhiber celle-ci en fin de nuit. De plus, le promoteur de l'*Aa-nat* contient une séquence ressemblant à une E-box dans sa partie distale (CACATG au lieu de CACGTG), ainsi qu'une E-box consensus et une y ressemblant dans le premier intron (Baler *et al.*, 1997; Baler *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 1999). La mutation des deux E-box du premier intron n'altère pas le rythme d'expression de l'*Aa-nat* chez le rat, mais permet l'expression ectopique de celle-ci (Humphries *et al.*, 2007). De plus, la transfection de CLOCK/BMAL1 n'induit pas l'*Aa-nat* dans la glande pinéale de rat, bien que ceux-ci se fixent sur le promoteur (Chen & Baler, 2000). Cependant, cette expérience permet d'induire l'*Aa-nat* dans la rétine, et la mutation des E-box introniques inhibe cette induction.

Il reste surprenant que ces gènes n'aient pas d'effet sur l'induction de l'*Aa-nat* chez les mammifères, alors qu'ils sont primordiaux dans l'établissement du rythme d'expression de l'*Aa-nat* dans la rétine ou dans la glande pinéale de certains poissons et du poulet. Ceci traduit certainement une différence de régulation entre un vrai oscillateur (rétine et glande pinéale de poissons et de poulet) et un oscillateur esclave (glande pinéale de mammifères).

Il est toutefois intéressant de noter ici que l'effet de la mutation des E-box ou la transfection avec les dimères CLOCK/BMAL n'a pas été testé en conjonction avec la stimulation noradrénergique. Il est tout à fait possible que ceux-ci n'interviennent pas seuls, mais en complément de pCREB. De plus, aucune expérience ne relate les effets d'une mutation de l'E-box contenue dans le promoteur distal de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale. Enfin, il est également possible que ces facteurs interviennent indirectement dans la régulation de l'expression de l'*Aa-nat*, en contrôlant d'autres gènes, par exemple l'Adénylate Cyclase dont le promoteur contient également une E-box (Chan *et al.*, 2001).

## F. Des régulateurs en devenir ?

### 1. Facteurs activateurs

Bien que son activation soit importante pour la réponse de l'*Aa-nat* à l'AMPc, CREB ne semble pas être le seul facteur de transcription activateur régulant cette dernière. En effet, la mutation de la séquence CRE n'abolit pas complètement la réponse de l'*Aa-nat* à l'AMPc, mais réduit celle-ci de 60 à 80% (Baler *et al.*, 1997). De plus, le traitement de pinéaloctes de rat avec de l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases, induit la phosphorylation de CREB sans stimuler l'expression de l'*Aa-nat* (Spessert *et al.*, 2000). D'autres facteurs semblent donc bien nécessaires à une réponse totale de l'*Aa-nat* à l'AMPc. Le promoteur distal de l'*Aa-nat* contient, en plus du site CRE, une boîte CCAAT inversée dont la mutation entraîne une diminution de 60 à 80% de l'activité transcriptionnelle (Baler *et al.*, 1997). De plus la double mutation de cette séquence et de la séquence CRE abolit totalement l'induction de l'*Aa-nat* par l'AMPc. Ces deux séquences semblent donc agir en synergie afin de conférer au promoteur de l'*Aa-nat* la capacité d'induire la transcription suite à la stimulation noradrénergique. Cependant, les facteurs de transcription impliqués dans ce mécanisme n'ont pas encore été identifiés.

Un régulateur potentiel pourrait être NF-Y. Ce facteur de transcription, se fixant spécifiquement sur les éléments CCAAT inversés, est exprimé dans la glande pinéale de rat et

régule la transcription basale et induite par l'AMPc de la *TpOH* (Côté *et al.*, 2002), dont le promoteur ne contient pas de sites CRE. NF-Y agit de concert avec Sp1, un autre facteur de transcription se liant aux régions riches en GC, pour induire la *TpOH* suite à la stimulation noradrénergique. De plus, ces deux facteurs sont également activés par la PKA (Faniello *et al.*, 1999; Rohlf *et al.*, 1997). Le promoteur de l'*Aa-nat* contenant ces deux séquences régulatrices, il n'est pas impossible qu'ils agissent de concert avec les protéines CREB/CREM/ATF pour induire une réponse maximale de l'*Aa-nat*, comme il a été démontré dans d'autres systèmes (Eggers *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). La glande pinéale exprime également des facteurs de transcription de la famille AP-2 ("Activating protein 2"). Ces facteurs montrent une activité nocturne (Davies & Carter, 2006), et ont été originellement décrits comme des facteurs de réponse à l'AMPc se fixant sur les éléments riches en GC (Williams *et al.*, 1988).

Un dernier facteur, CRX, semble important dans l'établissement du rythme d'expression de l'*Aa-nat*. Ce facteur se fixe sur les sites PIRE du promoteur distal et du premier intron du gène de l'*Aa-nat*. Il assurerait ainsi la spécificité tissulaire de l'expression de cette dernière (Baler *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998). Il est exprimé de manière circadienne, avec un maximum durant la nuit (Li *et al.*, 1998). L'importance de ce facteur est appuyée par le fait que sa mutation chez la souris diminue grandement l'expression de l'*Aa-nat* (Furukawa *et al.*, 1999). Il pourrait ainsi agir de concert avec la voie cAMP/PKA/pCREB afin de réguler l'expression des gènes dans la glande pinéale.

## 2. Facteurs répresseurs

En plus de ces facteurs activateurs identifiés et apparemment nécessaires à une stimulation totale de l'*Aa-nat*, d'autres facteurs de transcription inhibiteurs sont exprimés et actifs dans la glande pinéale. DREAM ("Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator") est un candidat fort intéressant. Il s'agit d'une protéine liant le  $Ca^{2+}$  et qui se fixe sur les sites DRE des promoteurs sous forme de tétramères. Elle réprime la transcription des gènes dépendant du  $Ca^{2+}$  et de l'AMPc (Ledo *et al.*, 2000b). Ce facteur est d'autant plus intéressant qu'il est inhibé par la PKA, *via* l'activation et l'interaction de DREAM avec CREM $\alpha$  (Ledo *et al.*, 2000a). Il interagit également avec CREB, *via* son activation par le  $Ca^{2+}$ , en séquestrant celui-ci, empêchant donc l'interaction entre pCREB et CBP (Ledo *et al.*, 2002). Il est exprimé dans la glande pinéale de rat, et son activité de liaison sur les sites DRE du promoteur de l'*Aa-nat*, est maximale durant le jour (Link *et al.*, 2004). Son action est

importante dans la répression de la transcription basale de l'*Aa-nat*, mais n'empêche pas l'induction de celle-ci suite à la stimulation par l'AMPC (Link *et al.*, 2004). Ainsi, DREAM participerait à la régulation du rythme d'expression de l'*Aa-nat* en réprimant la transcription basale de celle-ci durant le jour.

Id-1 appartient à la famille des protéines à domaine bHLH. Elle est cependant caractéristique car elle ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et agit donc comme un répresseur des autres facteur de transcription à domaine bHLH (Andres-Barquin *et al.*, 2000). Id-1 est exprimé selon un rythme journalier dans la glande pinéale de rat, avec un maximum en fin de nuit (Humphries *et al.*, 2002). Son rôle semble très intéressant, notamment par son interaction possible avec les gènes horloge, appartenant également à la famille des protéines bHLH. Il pourrait réprimer en fin de nuit l'action de CLOCK/BMAL1 en synergie avec PER/CRY. Cependant, vu que les protéines horloges ne semblent pas nécessaires à l'expression rythmique de l'*Aa-nat* (Humphries *et al.*, 2007), le rôle d'Id-1 dans la glande pinéale reste pour le moment inexpliqué.

Un dernier facteur répresseur de la transcription de l'*Aa-nat* a été mis en évidence récemment dans la glande pinéale de rat : NFκB ("Nuclear Factor κB"). Il pourrait créer un lien direct entre la voie des glucocorticoïdes et la synthèse de mélatonine. En effet, l'activité de l'AA-NAT et la synthèse de mélatonine sont potentialisées dans des cultures préalablement pré-incubées 48h avec de la corticostérone (Ferreira *et al.*, 2005). Cet effet est mimé par le traitement avec un inhibiteur spécifique de la translocation nucléaire de NFκB. Ainsi, les glucocorticoïdes, *via* la fixation sur leurs récepteurs, empêcheraient la translocation nucléaire de NFκB, ce qui permettrait une potentialisation de la synthèse de mélatonine.

## G. Modifications structurales de la chromatine

### 1. Histones et transcription

Chez les eucaryotes, l'ADN constitue une grande molécule qui doit être compactée pour être contenue dans le noyau. La chromatine apparaît sous la forme d'un "filament d'ADN" sur lequel il est possible d'observer de petites structures sphériques régulièrement disposées (Luger *et al.*, 1997a). Ces structures sont des complexes multiprotéiques, composés d'histones et autour desquels l'ADN s'enroule (Luger *et al.*, 1997b; Richards & Elgin, 2002). Chaque nucléosome est constitué de 8 histones (deux de chaque formes H2A, H2B, H3 et H4) constituant un "cœur" ficelé par 147 paires de bases d'ADN (Luger *et al.*, 1997b). Leurs

extrémités s'étendent à l'extérieur des nucléosomes, permettant leur modification et leur interaction avec l'ADN et/ou d'autres protéines. Ainsi, ces extrémités constituent des sites d'interaction avec diverses enzymes modifiant leurs propriétés par acétylation, phosphorylation, sumoylation, ubiquitination et méthylation, et permettant de modifier l'état de compaction de l'ADN (Berger, 2002; Orphanides & Reinberg, 2002; Richards & Elgin, 2002). Les facteurs de transcription activateurs et répresseurs influencent directement l'expression des gènes chez les eukaryotes par le recrutement de co-activateurs, dont la plupart ont des activités enzymatiques catalysant ces modifications des histones. Ceci permet de rendre le site d'initiation accessible ou non au complexe de préinitiation et à la PolII (Narlikar *et al.*, 2002). Par exemple, les protéines CBP et CLOCK ont des propriétés d'acétylation des histones (Doi *et al.*, 2006; Goldman *et al.*, 1997; McManus & Hendzel, 2001).

Parmi toutes les modifications, la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation des histones H3 ont été les plus étudiées. Elles permettent soit une activation soit une inhibition de la transcription en fonction du résidu modifié (Berger, 2002; Clayton *et al.*, 2006; Nowak & Corces, 2004; Shilatifard, 2006). D'une manière générale, un état inactif de la transcription (une compaction de l'ADN) est conduit par une déacétylation de la Lysine 14 suivie d'une méthylation de la Lysine 9. La phosphorylation de la Sérine 10, l'acétylation de la Lysine 14 et la méthylation de la Lysine 4 sont activatrices de la transcription (décompaction de la chromatine). L'aspect temporel de ces différentes modifications des histones apparaît extrêmement important dans la régulation de l'état d'activation de la transcription d'un gène.

## 2. Histones et glande pinéale

Il existe deux études relatant la régulation des modifications des histones dans la glande pinéale. La première a permis de montrer que la phosphorylation de l'histone H3 sur la Sérine 10 avait lieu rapidement en début de nuit dans la glande pinéale de rat, avant l'induction de l'Aa-nat (Chik *et al.*, 2007). Cette phosphorylation est dépendante de l'activation de la signalisation  $\beta$ -adrénergique, plus particulièrement l'AMPc. En milieu de nuit, il y a une déphosphorylation rapide de ce résidu suite à l'action de phosphatases. Ceci suggère que la phosphorylation de l'histone H3 en début de nuit est importante dans l'induction de l'Aa-nat.

Dans la deuxième étude, les mêmes auteurs ont montré que la déacétylation de la Lysine 14 de l'histone H3 est nécessaire à l'induction de l'Aa-nat. En effet, le traitement de pinéalocytes *in vitro* avec des inhibiteurs des enzymes déacétylant les histones inhibe fortement l'induction de l'Aa-nat (Ho *et al.*, 2007a). Au contraire, ce traitement résulte en une

stimulation de l'expression de l'ARNm de *c-fos*, montrant donc que l'effet d'une même modification est spécifique du gène considéré. Ce résultat sur l'*Aa-nat* est assez surprenant, étant contraire au schéma global généralement décrit (Berger, 2002). Cependant, le même effet a été décrit pour d'autres gènes dépendant de l'AMPc (Fass *et al.*, 2003).

Je relaterai ici une dernière étude que j'ai réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Anthony HO, lors d'un séjour dans son laboratoire. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un inhibiteur de la méthylation des histones sur l'expression de divers gènes régulés par l'AMPc dans la glande pinéale de rat. Nos résultats ont montré que l'ajout de cet inhibiteur réprimait l'induction de l'*Aa-nat* et d'*Icer*, mais qu'au contraire, celui-ci potentialisait l'induction de *c-fos*. De plus cet inhibiteur n'a d'effet qu'au début de la stimulation. Ces résultats montrent que la méthylation des histones est nécessaire à l'induction de l'*Aa-nat*, sans doute en permettant le recrutement du complexe de préinitiation. La méthylation de la Lysine 4 et de la Lysine 6 étant respectivement activatrice et inhibitrice (Berger, 2002), il serait intéressant de continuer cette étude en analysant le profil de méthylation de ces différents résidus suite à la stimulation noradrénergique.

#### **H. Conclusion : la transcription de l'*Aa-nat* est régulée par une balance temporelle précise de facteur de transcription activateurs et inhibiteurs**

L'induction de la synthèse de mélatonine chez le rat est essentiellement régulée par le contrôle de la transcription de l'*Aa-nat*. Cette induction dépend de l'activation et/ou de la synthèse de facteurs de transcription spécifiques agissant en synergie afin de contrôler précisément l'aspect temporel de l'expression des ARNm. Parmi ces facteurs, les rôles de pCREB et ICER ont été les plus étudiés dans la glande pinéale. La balance existant entre ces deux facteurs est à la base de l'initiation/répression de l'*Aa-nat* par l'AMPc. Cependant, d'autres facteurs de transcription interviennent certainement dans cette régulation. Parmi ceux-ci les facteurs du complexe AP-1, de par leurs interactions complexes avec les protéines des familles CREB/CREM/ATF, pourraient jouer un rôle répresseur et/ou activateur qu'il serait intéressant d'étudier plus en détail.

L'aspect temporel de l'expression des ces divers facteurs de transcription apparaît primordial dans l'établissement du rythme journalier et saisonnier de la synthèse de l'*Aa-nat*. Ceci est possible en régulant précisément l'état d'activation/répression du promoteur à chaque moment du nyctémère, en présence ou non de la stimulation noradrénergique.

## IV. Restriction temporelle de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien : objectifs de l'étude

La majorité des informations disponibles sur la régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale des mammifères provient des études effectuées chez le rat. Cependant, vu le rôle majeur que joue la mélatonine dans le contrôle des fonctions saisonnières, il est essentiel d'étudier cette régulation chez des animaux dont la physiologie est saisonnière. Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la régulation de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale du hamster syrien, un rongeur à physiologie saisonnière. Nous verrons ici en quoi la synthèse de mélatonine chez ce rongeur diffère ou non de celle observée chez le rat. Je poserai également ici les hypothèses de travail à l'origine des expériences réalisées au cours de cette thèse.

### A. Régulation transcriptionnelle nocturne de l'*Aa-nat*

La synthèse de mélatonine chez le hamster syrien est initiée par la libération nocturne de NA sur la glande pinéale. Elle est inhibée en LL ou suite à une ganglionectomie (Panke *et al.*, 1979; Vaughan & Reiter, 1986). Comme chez tous les rongeurs étudiés, la synthèse de mélatonine chez cette espèce dépend de la néotranscription de l'*Aa-nat* (Garidou *et al.*, 2003b; Garidou *et al.*, 2002b; Gauer *et al.*, 1999). Cette dernière est massivement régulée par l'augmentation d'AMPC induite par la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Garidou *et al.*, 2003b; Lipton *et al.*, 1981; Santana *et al.*, 1989a; Santana *et al.*, 1988a) et potentialisée par la stimulation  $\alpha$ -adrénergique (Garidou *et al.*, 2003b; Santana *et al.*, 1989b; Stankov *et al.*, 1990). L'initiation de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien semble donc similaire à celle observée chez le rat.

Cependant, il existe une nette différence dans le délai d'induction de la synthèse de mélatonine, qui est de 6 à 8 heures chez le hamster syrien, en comparaison des 4 à 5 heures nécessaires chez le rat. Il a été suggéré que ce délai était dû à une insensibilité de la glande pinéale à la NA en début de nuit. En effet, beaucoup d'études ont montré que l'induction de la synthèse de mélatonine chez cette espèce, *in vivo* ou sur des glandes pinéales en culture, par des agonistes adrénergiques n'était possible qu'en deuxième moitié de nuit (Reiter *et al.*, 1987a; Reiter *et al.*, 1987b; Santana *et al.*, 1988a; Santana *et al.*, 1988b; Steinlechner *et al.*,

#### IV. Objectifs

1985; Vaughan *et al.*, 1986; Vaughan *et al.*, 1987; Vaughan & Reiter, 1987). Cependant, ces études suggéraient implicitement un mécanisme d'induction identique à celui décrit chez le rat : elles ne mesuraient les effets que deux à quatre heures après l'application aiguë d'agonistes adrénergiques. Par la suite, il a été démontré que la glande pinéale du hamster syrien était bien sensible à la NA dès le début de la nuit, puisque des injections chroniques d'agonistes adrénergiques en fin d'après-midi avancent l'expression de l'*Aa-nat* et la synthèse de mélatonine de 2 à 4 heures (Garidou *et al.*, 2003b; Gonzalez-Brito *et al.*, 1988c). De même, cette induction est possible sur des glandes pinéales en culture prélevées en début de nuit et stimulées au moins 6 heures avec de la forskoline (Santana *et al.*, 1990). Ce délai semble plutôt dû au temps nécessaire à la néotranscription et/ou à l'accumulation de l'ARNm de l'*Aa-nat*. En effet, l'application d'actinomycine D en début de nuit ou en début de stimulation en culture inhibe la synthèse de mélatonine et l'activité de l'AA-NAT, alors qu'elle n'a aucun effet en milieu de nuit ou de stimulation (Gonzalez-Brito *et al.*, 1990; Santana *et al.*, 1990). Ceci a été confirmé suite au clonage de l'*Aa-nat* chez le hamster, ce qui a permis de montrer que le délai d'induction de l'ARNm est supérieur à celui observé chez le rat : 5 à 6 heures contre 3 à 4 heures (Garidou *et al.*, 2003b; Gauer *et al.*, 1999; Roseboom *et al.*, 1996). Le long délai d'induction de la synthèse de mélatonine chez le hamster vient donc d'une induction retardée de l'*Aa-nat*.

Il est possible que ce retard dans l'induction de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien soit dû à une libération plus tardive de la NA en début de nuit que chez le rat. Cependant, une étude récente a proposé que ce délai soit dû à l'existence d'une étape supplémentaire dans la transcription de l'*Aa-nat*. En effet, l'injection de cycloheximide en début de nuit inhibe fortement, mais pas totalement (50 à 70%), l'expression nocturne de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien (Garidou *et al.*, 2003b), mais pas chez le rat (Roseboom *et al.*, 1996). Ce résultat suggère fortement que l'induction de l'*Aa-nat* chez le hamster est dépendante de la néosynthèse de protéines activatrices en début de nuit.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le rôle probable des facteurs de transcription du complexe AP-1 pour plusieurs raisons : 1) ce sont des facteurs de transcription nécessitant une néosynthèse avant d'exercer leur action, 2) leur rôle stimulateur a été décrit dans de nombreux systèmes cellulaires, et 3) le promoteur de l'*Aa-nat* chez plusieurs espèces contient au moins un site AP-1 à proximité du site d'initiation. Nous avons étudié l'expression de ces divers facteurs (en particulier c-FOS et c-JUN) chez le hamster, mais également chez le rat, afin de déterminer si des différences entre ces deux espèces pouvaient expliquer la divergence dans le délai d'induction de l'*Aa-nat* observé. En parallèle, CREB

ayant été décrit comme important dans l'induction de l'*Aa-nat* chez le rat, nous avons également déterminé son profil d'expression chez le hamster.

### B. Restriction diurne de l'induction de l'*Aa-nat*

Le hamster syrien est également caractérisé par une restriction de la synthèse de mélatonine uniquement à la phase nocturne du nyctémère. En effet, celle-ci nécessite non seulement une longue période de latence de 6 à 8 heures avant d'être induite (voir paragraphe précédent), mais elle est également impossible à stimuler durant le jour, *in vivo* ou sur des glandes pinéales en culture (Lipton *et al.*, 1982; Reiter *et al.*, 1987a; Reiter *et al.*, 1987b; Santana *et al.*, 1988a; Santana *et al.*, 1988b; Vaughan *et al.*, 1986; Vaughan *et al.*, 1987; Vaughan & Reiter, 1987). Cette incapacité à stimuler la synthèse de mélatonine durant le jour chez le hamster semble directement liée à un blocage de l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* (Garidou *et al.*, 2003b). Notons toutefois que la majorité de ces études ont mesuré l'effet des agonistes adénergiques 2 à 4 heures après la stimulation, ne tenant donc pas compte du délai nécessaire à l'induction de l'ARNm de l'*Aa-nat*. Cependant, le blocage de l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* a également été mis en évidence *in vivo* suite à des injections chroniques d'agonistes adrénérgiques sur une durée de 7 heures (Garidou *et al.*, 2003b).

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ce phénomène de blocage diurne :

- La première est un blocage transcriptionnel de l'induction de l'*Aa-nat*. En effet, l'injection de cycloheximide en milieu de nuit à des hamsters syrien *in vivo* permet l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* en début de jour suivant (Garidou *et al.*, 2003b). Ceci suggère que ce blocage serait dû à la synthèse nocturne d'une protéine (un facteur de transcription ?), présente durant le jour pour inhiber la transcription de l'*Aa-nat*.
- La deuxième est un blocage de la voie de signalisation noradrénergique. En effet, la production d'AMPC dans des glandes pinéales, prélevées en milieu de jour et mises en culture, est plus importante suite à une stimulation par de la forskoline que suite à une stimulation par un agoniste  $\beta$ -adrénergique (Santana *et al.*, 1988c).

Plusieurs éléments nous ont tout d'abord conduit à étudier le rôle de la protéine ICER dans la mise en place de la restriction diurne de la transcription de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien : 1) ICER a été décrit comme un très fort répresseur des gènes induits par l'AMPC, et plus particulièrement l'*Aa-nat*, en entrant en compétition avec pCREB pour l'accès aux sites

#### IV. Objectifs

CRE des promoteurs, et 2) ICER est une protéine très stable dont le taux est élevé durant le jour dans la glande pinéale de rat. Nous avons alors étudié le profil d'expression journalier de l'ARNm et de la protéine ICER afin de voir si le blocage diurne de l'induction de l'*Aa-nat* pouvait être expliqué par une forte expression diurne de cette protéine.

En parallèle, nous avons étudié la possible implication d'un blocage de la voie de signalisation noradrénergique durant le jour. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié si ce blocage concernait également d'autres facteurs induits par l'AMPC tels que c-FOS et pCREB.

Enfin, pour compléter cette étude, nous avons analysé le rôle de l'horloge centrale dans la régulation de la mise en place de ce phénomène de restriction dans la glande pinéale de hamster syrien.

#### C. Régulation photopériodique de l'*Aa-nat*

La mélatonine délivre un message temporel à l'organisme par la variation de sa durée de présence dans le plasma, donc de sa durée de synthèse, en relation avec la durée de la nuit. Chez la plupart des espèces, cette variation dans la durée du pic de mélatonine est directement contrôlée par la durée de l'activité nocturne de l'AA-NAT. Chez les rongeurs, l'allongement de cette activité enzymatique est directement dépendant d'un allongement de la transcription de l'*Aa-nat*. Chez certaines espèces, l'amplitude du pic de mélatonine varie également, pour augmenter en photopériode courte, essentiellement grâce à une augmentation de l'activité de l'HIOMT (voir **section II**). Chez certaines espèces (rat et hamster sibérien), l'amplitude de l'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* et l'activité de l'enzyme diminuent en photopériode courte. Chez le hamster syrien, les variations photopériodiques de la synthèse de mélatonine sont caractérisées par un allongement de la durée de transcription de l'*Aa-nat* et une forte diminution de l'amplitude d'expression de l'ARNm en photopériode courte (Garidou *et al.*, 2003b). Ceci n'a toutefois pas de conséquences sur l'amplitude du pic de mélatonine, sauf lorsque les animaux sont en photopériode naturelle où ce pic est plus ample en photopériode courte (Brainard *et al.*, 1982). De plus, la régulation de l'induction de l'*Aa-nat* semble différente chez cette espèce. En effet, chez le rat et le hamster sibérien, le délai d'induction de l'expression de l'*Aa-nat* et de la synthèse de mélatonine augmente avec l'allongement de la durée de la nuit (voir **section II**), alors que ce délai ne varie pas en fonction de la photopériode chez le hamster syrien (Garidou *et al.*, 2003b; Miguez *et al.*, 1995; Reiter,

1993a). De plus, la terminaison de la transcription de l'*Aa-nat* et de la synthèse de mélatonine chez cette espèce diffère en fonction de la photopériode considérée : elle est initiée par l'arrivée de la lumière en photopériode longue et contrôlée par l'horloge en photopériode courte, car elle débute avant la fin de la nuit. Chez le rat, cette différence d'expression photopériodique de l'ARNm de l'*Aa-nat* semble due à l'expression différentielle du facteur de transcription inhibiteur ICER, plus forte en début de nuit photopériode courte, expliquant ainsi l'allongement du délai dans l'induction de la synthèse de mélatonine (voir section **III.C**).

Nous avons ici cherché à déterminer si la présence d'ICER variait avec la photopériode, et surtout si la diminution d'amplitude du pic d'expression de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien pouvait être due à un taux nocturne plus élevé de celui-ci. Parallèlement, cette étude du profil photopériodique d'expression d'ICER et de pCREB pourra nous permettre d'envisager le rôle de la balance d'expression entre ces deux facteurs dans les variations de l'induction et de la terminaison de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien.

#### **D. Conclusion**

La régulation cellulaire et moléculaire de la synthèse de mélatonine a été essentiellement étudiée chez le rat, longtemps considéré comme le modèle de référence pour l'ensemble des rongeurs. Cependant, il apparaît aujourd'hui que des divergences existent en fonction de l'espèce de rongeur considérée et de son caractère photopériodique ou non. Ainsi, chez le hamster syrien, la restriction temporelle de la synthèse de mélatonine semble être contrôlée de manière beaucoup plus stricte que chez le rat.

L'ensemble des études réalisées au cours de ma thèse vise à améliorer nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien. Ces études ont permis de comprendre en quoi ces mécanismes diffèrent de ceux décrits chez le rat, mais surtout leur importance dans la mise en place du rythme photopériodique de synthèse de mélatonine dans la glande pinéale.

# *Matériels et méthodes*



## **I. Animaux et prélèvements des tissus**

### **A. Stabulation**

Les hamsters syriens utilisés dans le cadre des études composant cette thèse étaient des femelles élevées dans l'animalerie de notre laboratoire (chronobiotron). Pour les différentes expériences, elles étaient âgées de 8 à 10 semaines à la date de début de l'expérience. Les animaux, 3 à 6 par cage, étaient gardés en conditions constantes de température et d'humidité et avaient de la nourriture et de la boisson à volonté. Ils étaient également soumis à un cycle LD de 14 heures de lumière et 10 heures d'obscurité (lumière rouge de 19h à 05h, intensité inférieure à 2 lux). Dans le cas des études en photopériode courte, des animaux âgés de 5-6 semaines ont été transférés en conditions lumineuses de 10 heures de lumière et 14 heures d'obscurité (lumière rouge de 19h à 09h, intensité inférieure à 2 lux) pendant 10 semaines.

### **B. Prélèvements**

#### **1. Pour l'immunohistochimie**

Les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane et la cage thoracique est ouverte afin de dégager l'accès au cœur, qui doit toujours battre. De l'héparine (100 µl à 25.000 IU/ml) est injectée dans le ventricule gauche pour éviter la coagulation du sang dans les vaisseaux, ce qui nuirait à la bonne perfusion du fixateur. Après quelques secondes, l'oreillette droite puis le ventricule gauche sont incisés et une canule est enfoncée dans le ventricule gauche jusqu'à l'aorte. Une solution de PBS 1X ("Phosphate Buffer Saline" : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM ; pH 7,4) est d'abord perfusée pendant 1 à 2 minutes afin d'éliminer le sang au maximum. Puis celle-ci est remplacée par une solution de fixateur composée de formaldéhyde dilué à 4% dans du tampon phosphate 100 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 19 mM, pH 7,4). Après fixation, la tête entière est prélevée et gardée dans le fixateur pendant 24 heures à 4°C. Ensuite, le cerveau est disséqué, en prenant garde de laisser la glande pinéale en place, et replacé dans le fixateur pendant 24 heures à 4°C. Le cerveau fixé est ensuite rincé une première fois pendant 30 minutes, puis pendant une nuit dans du PBS 1X afin de laver le fixateur.

### 2. Pour l'hybridation *in situ* et le Western-Blot

Les animaux sont anesthésiés au CO<sub>2</sub> puis décapités. Pour l'hybridation *in situ*, les cerveaux sont congelés sur de la carboglace et conservés à -80°C jusqu'à la coupe. Les cerveaux congelés sont coupés à une épaisseur de 18 µm à l'aide d'un cryomicrotome (cryostat, LEICA). Les coupes sont ensuite montées sur des lames histologiques stériles préalablement gélatinées afin d'améliorer l'adhérence, puis conservées au congélateur à -80°C avant utilisation pour l'hybridation. Pour le Western Blot, les pinéales sont prélevées et congelées dans des tubes Eppendorf® sur de la carboglace, à raison de 2 ou 3 par tube. Elles sont ensuite conservées à -80°C jusqu'à la réalisation des homogénats cellulaires.

### 3. Pour les cultures organotypiques

Les animaux sont anesthésiés, puis décapités. Les glandes pinéales sont prélevées et mises dans du milieu de culture [MC : DMEM (Sigma); NaHCO<sub>3</sub> 43,5 mM; pH 7,3; supplémenté en pénicilline 100 unités/ml et en streptomycine 100 µg/ml] sur glace. Les glandes pinéales sont alors nettoyées de leurs méninges puis placées sur des inserts de culture (Millipore) dans des plaques 6 puits contenant 1,2 ml de MC, à raison de 3 à 4 par membrane selon l'expérience. Les glandes pinéales sont alors incubées pendant 30 minutes à 37°C sous une atmosphère à 95% d'O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub>, puis soumises aux différentes conditions expérimentales. A la fin de l'expérience, elles sont congelées dans des tubes Eppendorf®, puis conservées à -80°C jusqu'à la réalisation des homogénats pour le Western-Blot ou la RT-PCR.

## II. Immunohistochimie

### A. Inclusion, coupe et montage sur lames

Cette étape permet de durcir les blocs de tissu et de les inclure dans une matrice de polyéthylène glycol (PEG, ACROS ORGANICS) afin de réaliser des coupes (Klosen *et al.*, 1993). Le PEG est un composé solide à température ambiante et liquide à plus haute température (la température de fusion variant en fonction de son poids moléculaire). Il est hydrosoluble et se dissout totalement lors du montage des coupes sur lames.

Avant l'inclusion, les cerveaux fixés sont déshydratés selon la séquence suivante : un bain d'1h d'éthanol 70° ; un bain d'1h d'éthanol 95° ; deux bains d'1h d'éthanol 100° ; un

bain d'au moins une nuit de n-butanol (améliore l'adhérence des tissus riches en lipides). Après la déshydratation, la procédure d'inclusion s'effectue selon la séquence suivante : un bain de 4 à 5h de PEG 1000 (poids moléculaire) à 55°C ; un bain d'une nuit de PEG 1000 à 55°C ; un bain de 4 à 5h d'un mélange PEG 1000/1500 (vol./vol.) à 55°C ; un bain d'une nuit de PEG 1000/1500 à 55°C. Le mélange PEG 1000/1500 va définir l'épaisseur des coupes : plus il y a de PEG 1500, plus le bloc sera dur et plus les coupes pourront être fines. Les cerveaux sont ensuite placés dans des moules et recouverts de PEG 1500 et le tout est placé à 55°C pendant 30 min pour supprimer les bulles d'air. Les moules sont ensuite laissés à température ambiante pendant environ 2h afin d'assurer un durcissement progressif et homogène du PEG. Les blocs sont alors prêts à être coupés.

Les blocs de tissu sont débités en coupes de 8 µm à l'aide d'un microtome (LEICA). Les rubans de coupes obtenus contenant la glande pinéale sont conservés dans des boîtes en carton à l'abri des hautes températures et de l'humidité. Les coupes sont ensuite montées sur des lames Superfrost® Plus (Menzel-Gläser) dans une solution de saccharose 2%, qui permet une bonne adhérence des coupes sur la lame, ainsi qu'une bonne conservation de l'immunoréactivité (Klosen *et al.*, 1993). Les coupes sont ensuite séchées pendant 15 min à 45°C pour assurer une bonne adhérence. Elles peuvent alors être utilisées directement pour l'immunodétection ou conservées dans de l'eau à 4°C contenant un antifongique (azide de sodium 0,02%) pour une utilisation ultérieure.

### **B. Immunodétection des antigènes**

Les lames sont incubées pendant 1h avec une solution de lait non gras à 3% dans du TBS 1X ("Tris Buffered Salt" : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 20 mM ; NaCl 154 mM ; pH 7,6)-Tween20 0,05% afin de saturer les sites de liaison aspécifiques, puis elles sont incubées une nuit, à température ambiante en chambre humide, avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de TBS 1X-Tween20 0,05%-SVF (sérum de veau fœtal) 1%. Les concentrations et les caractéristiques des anticorps utilisés sont données dans le tableau 1.

Les coupes sont ensuite lavées 3 fois 10 min avec du TBHS 1X ("Tris Buffered High Salt" : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 20 mM ; NaCl 500 mM ; pH 8,6)-Tween20 0,05%, puis incubées pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire biotinyllé d'âne anti-lapin (Jackson), dilué au 1/2000 dans une solution de TBS 1X-Tween20 0,05%-SVF 1%. Ensuite, les coupes sont lavées 3 fois 10 min dans du TBHS 1X-Tween20 0,05%, puis

## II. Immunohistochimie

incubées avec de la streptavidine-peroxydase (Roche) diluée au 1/2000 dans une solution de TBS 1X-Tween20 0,05%-CWFS 0,25% (gélatine de peau de poisson). La streptavidine est couplée de façon covalente à la peroxydase et peut se fixer à plusieurs molécules de biotine. Il en résulte une amplification du signal par rapport à l'anticorps secondaire couplé uniquement à de la peroxydase.

A la fin, les coupes sont lavées 3 fois 10 min dans du TBHS 1X-Tween20 0,05%, puis 10 min dans une solution de TBI 1X ("Tris Buffered Imidazole" : Tris 50 mM ; imidazole 10 mM ; pH 7,6), et enfin incubées avec la solution de révélation composée de diaminobenzidine (DAB, 0,5 mg/ml) et de peroxyde d'hydrogène (0,003%) dans du TBI 1X. Lors de la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau par la peroxydase, une réaction d'oxydoréduction se produit et la diaminobenzidine est dégradée en un composé formant un précipité brun, visible au microscope. Les coupes sont ensuite longuement rincées d'abord dans du TBS 1X, puis dans de l'eau ultra pure, déshydratées dans des bains d'alcools de degré croissant, puis montées entre lame et lamelle dans l'Eukitt.

Protéine cible	immunogène	Fournisseur	Dilution
<b>CREB</b>	extrémité C-terminale de la protéine humaine	EUROMEDEX	1/2000
<b>pCREB</b>	acides aminés 123 à 136 de la protéine chez le rat (contenant la Ser133 phosphorylée)	EUROMEDEX	1/2000
<b>c-FOS</b>	extrémité N-terminale de la protéine humaine	SANTA-CRUZ	1/2000
<b>c-JUN</b>	extrémité N-terminale de la protéine humaine	SANTA-CRUZ	1/500
<b>ICER</b>	Protéine ICER I $\gamma$ entière	Dr Françoise MIOT	1/2000

**Tableau 1 : Récapitulatif des anticorps utilisés pour l'immunohistochimie et le Western Blot.**

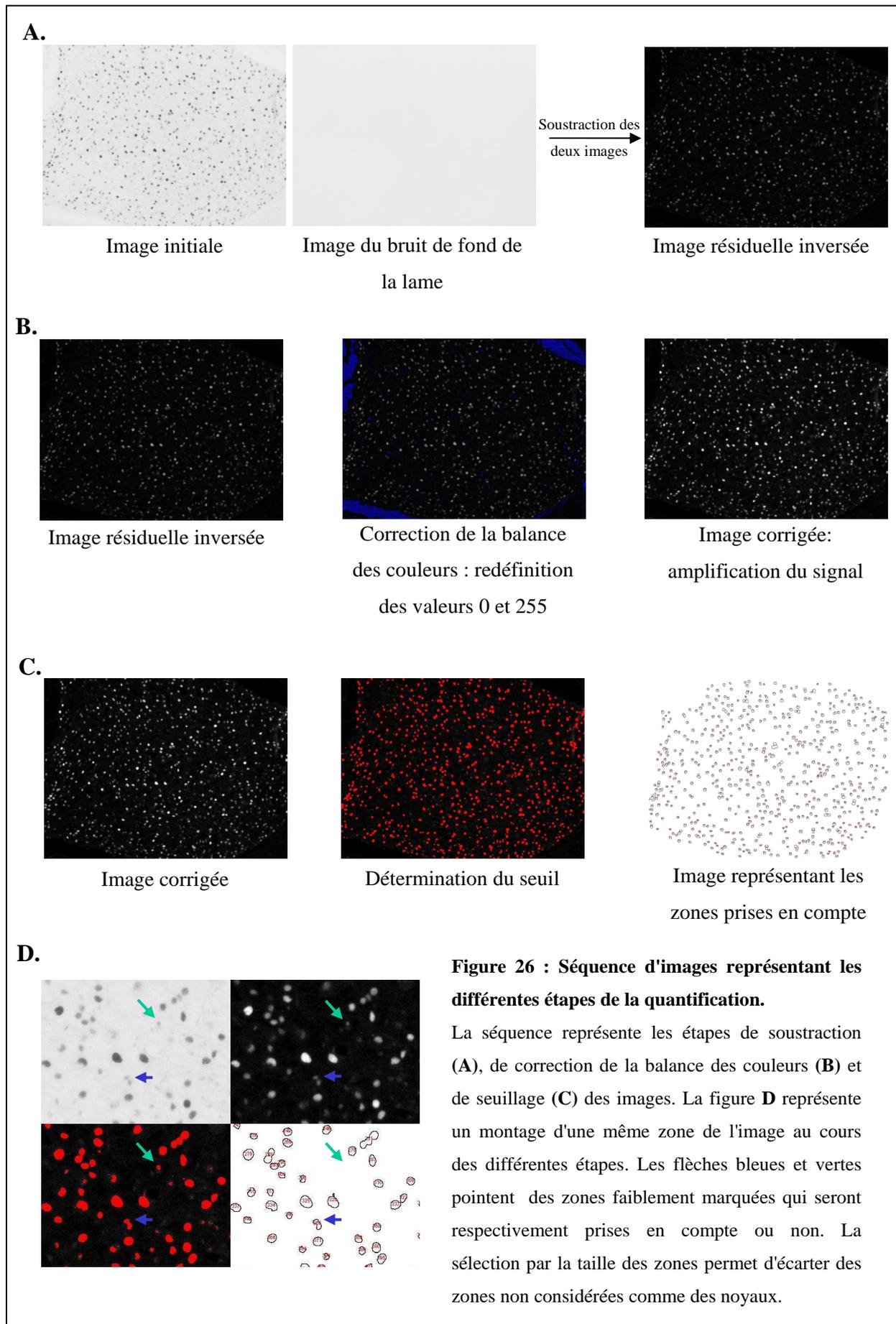
### C. Quantification

Afin d'assurer une quantification fiable et reproductible de l'immunoréactivité des coupes, une attention particulière a été prise dans les différents traitements des coupes et dans l'organisation de celles-ci. Ainsi, toutes les lames d'une même expérience ont été traitées simultanément avec la même quantité de produits. Par exemple, les anticorps sont préparés en

une seule fois et sont ensuite dispersés sur les lames à raison de 50 µl de solution par coupe. Les lavages et la révélation ont été effectués dans de grands volumes pour que toutes les lames soient traitées simultanément et pendant exactement le même temps. Dans le cas des études photopériodiques les lames appartenant aux deux photopériodes ont été traitées exactement au même moment. Par ailleurs, l'expression des différentes protéines a été analysée sur des coupes adjacentes. Trois coupes par animal, prélevées à différents niveaux de la glande pinéale, ont été analysées pour chaque expérience. De plus, des tests de dilution ont été effectués pour chaque anticorps afin de définir le meilleur rapport signal/bruit de fond et de s'assurer que le marquage obtenu n'est pas saturé.

Après la réaction d'immunohistochimie, les images des glandes pinéales sont prises à l'aide d'un microscope (DMRB, LEICA) couplé à une caméra numérique (DP50, Olympus). Tous les paramètres de luminosité et de contraste sur le microscope et le programme d'acquisition (Viewfinder Lite, Olympus) ont été déterminés sur la première pinéale de chaque expérience et ont été gardés constants pour toutes les autres coupes. Les images ont été enregistrées en niveaux de gris (8 bits) à une résolution de 1392x1040 pixels. L'image est décomposée en pixels dont l'intensité lumineuse est codée par un nombre entre 0 et 255 : 0 correspondant à la valeur maximale d'intensité (pixels blancs) et 255 correspondant à la valeur minimale (pixels noirs). Dans ce cas, plus les zones de la coupes auront fixé les anticorps et réagi à la révélation, moins elles laisseront passer la lumière et plus elles apparaîtront sombres. Inversement pour les zones n'ayant pas réagi.

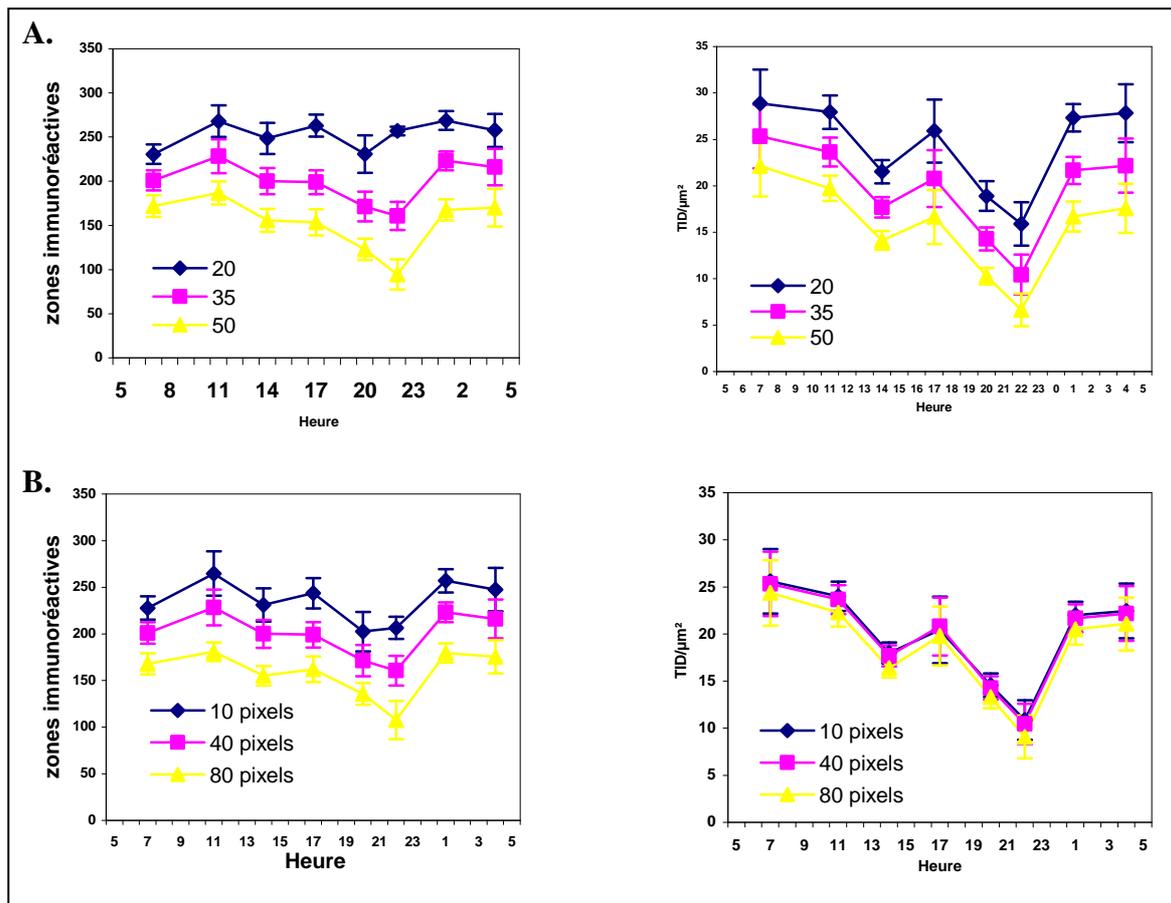
Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel *Image J*. La procédure d'analyse et de quantification est expliquée en images sur la **figure 26**. La première étape est la soustraction de l'image de bruit de fond de l'image à analyser. Pour chaque lame, une image d'une zone vide ne comportant aucune coupe (bruit de fond de la lame) est prise et a été soustraite aux images des coupes de la même lame afin d'éviter les problèmes d'hétérogénéité de l'éclairage du microscope. Il en résulte une image inversée sur fond noir : les pixels représentant un marquage apparaissent maintenant en blanc, et le bruit de fond apparaît en noir (**figure 26A**). Ensuite, les paramètres colorimétriques de cette image résiduelle sont ré-étalonnés afin d'amplifier le signal spécifique (**figure 26B**). Concrètement, nous faisons apparaître les pixels les plus et les moins marqués et leur donnons une nouvelle valeur : 0 pour les moins marqués et 255 pour les plus marqués. Par exemple, une image dont les valeurs minimale et maximale étaient de 0 et 140, a maintenant des valeurs de 0 et 255, les pixels intermédiaires étant ré-étalonnés proportionnellement. Une vérification de



l'histogramme de l'image (représentant le nombre de pixels caractérisé par chaque valeur comprise entre 0 et 255) est faite afin de s'assurer que cette modification ne sature pas l'image dans les hautes valeurs, ce qui nuirait à la quantification. Pour chaque expérience individuelle et pour chaque anticorps utilisé, cette manipulation est faite sur la coupe la plus marquée de la série, les autres images étant ré-étalonnées avec exactement les mêmes paramètres. Une zone de la coupe (la plus grande possible) est alors sélectionnée et mesurée pour calculer la surface. C'est à l'intérieur de cette section que la quantification des zones immunoréactives spécifiques sera faite.

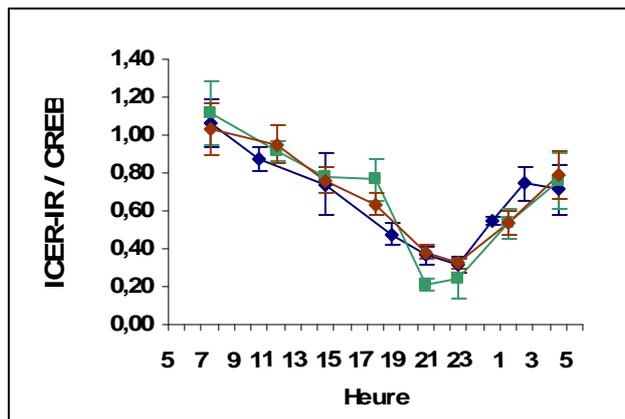
Afin de ne quantifier que le marquage spécifique d'intérêt, les images sont ensuite fragmentées. Concrètement, il s'agit ici de déterminer une valeur d'intensité minimale en dessous de laquelle les pixels ne seront pas pris en compte dans la quantification (bruit de fond). Par exemple, si le seuil est déterminé à 40, tous les pixels dont la valeur est comprise entre 40 et 255 seront quantifiés, et ceux dont la valeur est comprise entre 0 et 39 ne seront pas pris en compte. Ceci permet, dans notre cas, de ne considérer que le marquage nucléaire, en s'affranchissant du bruit de fond représenté par la matrice du tissu et le cytoplasme des cellules (**figure 26C**). En parallèle, une taille minimale et maximale des zones à quantifier est déterminée. Ceci permet d'écarter de la quantification les zones trop petites pour être considérées comme des noyaux ; cette valeur est fixée à 40-50 pixels (8-10  $\mu\text{m}^2$ ). En conséquence, toutes les zones présentes après seuillage et composées de moins de 40 pixels contigus seront écartées de la quantification. Ceci permet donc de faire une double sélection des zones immunoréactives (taille et intensité) pour écarter assez efficacement les zones de marquage non spécifiques (**figure 26D**). Afin d'homogénéiser la quantification entre les différentes coupes d'une même expérience, ces paramètres sont définis et gardés constants pour toutes les coupes.

Cette méthode permet de mesurer différents paramètres : le nombre de zones immunoréactives, la surface représentée par le marquage, la densité moyenne et la densité totale du marquage, etc. Le paramètre que nous avons choisi d'exploiter est appelé densité intégrée totale (TID). Il s'agit en fait de la somme des valeurs de tous les pixels au dessus du seuil dans la zone de quantification dessinée. Comme la zone quantifiée n'est pas identique pour toutes les coupes, cette valeur a été normalisée par rapport à la surface de la zone quantifiée en  $\mu\text{m}^2$  (TID/ $\mu\text{m}^2$ ). Ceci permet de normaliser les valeurs entre toutes les coupes. Ce paramètre est très intéressant, car il prend en compte à la fois la densité du marquage spécifique, sa surface, mais également le nombre de zones immunoréactives.



**Figure 27 : Effet de la modification de la taille des particules et du seuil sur la quantification de l'expression journalière de la protéine ICER. (A)** Effet de la variation du seuil sur le nombre de zones immunoréactives comptées et sur le TID/μm<sup>2</sup>. La quantification est effectuée pour 3 valeurs de seuil différentes (20, 35 et 50). La taille des particules comptées est constante et fixée à 40 pixels. **(B)** Effet de la variation de la taille des particules sur le nombre de zones immunoréactives comptées et sur le TID/μm<sup>2</sup>. La quantification est effectuée pour 3 tailles de particules différentes (10, 40 et 80 pixels). Le seuil est gardé constant et fixé à 35.

Dans cette méthode, il y a 3 étapes cruciales qui requièrent une attention spécifique: 1) la détermination des paramètres pour ré-étalonner la balance des couleurs; 2) la détermination du seuil et 3) la détermination de la taille des particules à prendre en compte. Un exemple de variations des valeurs finales en fonction du seuil ou de la taille des particules est donné en **figure 27**. A taille de particules constante, les valeurs obtenues sont plus élevées lorsque le seuil diminue, mais le profil général reste le même. A seuil constant, la variation de la taille des particules n'a aucun effet sur le TID/μm<sup>2</sup>. En ce qui concerne le nombre de zones immunoréactives, les valeurs moyennes augmentent lorsque la taille des particules diminue, mais le profil global ne change pas.



**Figure 28 : Variations journalière de l'expression de la protéine ICER dans la glande pinéale de hamster syrien.** Les résultats représentent l'expression d'ICER obtenue pour 2 lots d'animaux différents (courbe bleue comparée aux courbes rouge et verte) et pour deux réactions d'immunohistochimie différentes au sein d'un même lot (courbes rouge et verte). Les données sont exprimées comme le ratio entre le TID/ $\mu\text{m}^2$  obtenu pour ICER et CREB sur des coupes adjacentes (ICER-IR/CREB-IR). Pour chaque point, la moyenne  $\pm$  SEM de 4-5 animaux est représentée. Il n'y a aucune différence significative entre les 3 profils (ANOVA à deux facteurs par couple de courbes,  $p > 0,05$ ).

Par la suite, les résultats obtenus pour un facteur de transcription nucléaire (ICER, pCREB ou c-FOS) ont été normalisés par rapport aux valeurs obtenues pour CREB sur des coupes adjacentes. En effet, nous avons vérifié que l'expression de CREB ne variait pas sur 24 heures, afin de l'utiliser comme témoin d'expression constitutive. Cette dernière normalisation nous a donc permis de nous affranchir des variations inter-individuelles (quantité d'expression, fixation). Cette méthode de quantification nous a donc permis de réaliser des quantifications fiables et reproductibles de signaux biologiques en immunohistochimie (**figure 28**).

### III. Hybridation *in situ*

#### A. Synthèse des ribosomes

Les sondes utilisées sont des sondes d'ARN (ribosonde), permettant une meilleure hybridation que des sondes d'oligonucléotides. Dans le premier article, une autre méthode d'hybridation pour l'*Aa-nat* a été utilisée. Celle-ci utilise des oligonucléotides et est décrite en détail dans le Matériel et Méthodes de l'**article 1**.

### III. Hybridation in situ

Les plasmides utilisés pour la synthèse des sondes ont été clonés, séquencés et amplifiés préalablement au laboratoire. Je ne décrirai donc ici la synthèse de sonde qu'à partir de la linéarisation de ces stocks de plasmides. Leurs caractéristiques ainsi que les différentes enzymes nécessaires à leur linéarisation et à leur transcription sont donnés dans le tableau 2.

	N° d'accession GenBank	Provenance	Taille (nucleotides)	Enzyme de linéarisation	Enzyme de transcription
<i>Aa-nat</i>	Séquence de hamster syrien <b>AF092100</b>	Laboratoire (Gauer <i>et al.</i> , 1999)	1045	nc	AS: T7 S: T3
<i>c-fos</i>	Séquence de hamster syrien <b>AF061881</b> (nt 628-1025)	Laboratoire (Dr Jérôme Menet)	398	AS: <i>speI</i> S: <i>sacII</i>	AS: T7 S: SP6
<i>Icer</i>	Séquence de hamster syrien <b>AY225377</b>	Laboratoire (Diaz <i>et al.</i> , 2003)	591	AS: <i>BamHI</i> S: <i>NorI</i>	AS: T3 S: T7

Tableau 2 : Caractéristiques des ribosondes utilisées pour l'hybridation in situ

#### 1. Linéarisation des plasmides

Le plasmide (50 µg) est linéarisé (37°C ; 1 nuit) avec 5µl d'une enzyme de restriction spécifique (10 U/µl et 1 µl/10 µg de vecteur, Fermentas) selon la sonde voulue (sens ou antisens), en présence de 5 µl de tampon d'enzyme 10X (Fermentas) contenant de la BSA (0.1 µg/µl). La linéarisation est vérifiée par électrophorèse (80V ; 50 mA) sur gel d'agarose (agarose 0,8 % ; 35 ml tampon tris borate EDTA (TBE) 1X, Euromedex ; 1 µl de bromure d'éthidium 10 mg/ml, Fermentas). 1 µl de plasmide sont mis à migrer pendant 1h30 en présence d'un tampon salin (500 ml TBE 1X ; 4 µl bromure d'éthidium), puis l'ADN est visualisé sous lumière UV à 254 nm. Comme la conformation d'un plasmide linéaire diffère de celle d'un plasmide circulaire, la distance parcourue par les deux plasmides doit être différente, c'est-à-dire que le plasmide linéarisé migre plus vite.

L'ADN linéarisé est ensuite purifié par une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. La solution d'ADN est mise en présence de 50 µl de phénol/chloroforme/Iso-amyl-alcool, puis après mélange et centrifugation (13000 g ; 5 min ; 4°C), la phase aqueuse est récupérée et 50 µl d'eau ultrapure sont ajoutés au culot qui est recentrifugé afin de récupérer le maximum d'ADN. Une fois toute la phase aqueuse récupérée,

celle-ci est mise en présence de 100 µl de chloroforme, vortexée et centrifugée (13000 g ; 5 min ; 4°C). Le surnageant (environ 80 µl) est récupéré et 1/10<sup>e</sup> de son volume en acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol 100% sont ajoutés (environ 8 µl et 200 µl respectivement); ceci afin de permettre la précipitation de l'ADN. Après 2h à une nuit à -20°C le tout est centrifugé à 12000 rpm pendant 20min à 4°C. Le culot ainsi obtenu est lavé deux fois à l'éthanol 80% (-20°C) afin d'éliminer les sels, centrifugé, et le culot est séché. Il est repris dans de l'eau stérile afin d'obtenir une concentration de plasmide linéarisé d'environ 1 µg/µl.

## 2. Transcription des ribosondes radioactives

La transcription des ribosondes est réalisée avec le kit MAXIscript (Ambion) selon les recommandations du fabricant. Dans l'ordre, sous hotte, sont ajoutés 2.5 µl de tampon de Transcription 10X, 1 µg d'ADNc (plasmide linéarisé), 1 µl de ATP, CTP et GTP, 1 µl d'UTP dilué au 1/40<sup>e</sup>, 1 µl de DTT 0.75 M, 1 µl soit 1 U de RNAsine (pour inhiber les RNases), 4 µl de <sup>35</sup>S-UTP (50 µCi) et 1µl d'enzyme de transcription (T3, T7 ou SP6, 10 U/µl), de l'eau ultrapure qsp 25 µl. La réaction de transcription s'effectue à 37°C pendant 2h puis après ajout de 2 µl d'ADNase encore pendant 30 min. Le volume du milieu de synthèse de ribosonde est additionné d'un même volume d'eau autoclavée, puis déposé sur une colonne (Chroma-spin30; Ozyme) préalablement équilibrée qui est mise à centrifuger pendant 5 min à 1400 rpm. Le principe de cette purification est de retenir dans la colonne les molécules inférieures à 17 pb. Ainsi, le <sup>35</sup>S-UTP non incorporé et le plasmide digéré sont retenus dans la colonne. La sonde purifiée éluée est utilisée tout de suite ou stockée à -20°C. Afin de vérifier le pourcentage d'incorporation de l'UTP radioactif, une fraction (1 µl) du mélange est prélevée avant et après centrifugation et placée dans 4ml de liquide de scintillation, permettant ainsi de procéder au comptage de la radioactivité en cpm avec un compteur d'émissions β.

## B. Hybridation et détection du signal

### 1. Pré-hybridation

Afin de préserver la qualité des tissus, le premier traitement consiste en une fixation de 15 min par le paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS 1X. Les lames sont ensuite rincées deux fois 5 min dans du PBS 1X. Les coupes sont soumises à un second traitement, triéthanolamine 0.1 M en présence d'anhydride acétique pendant 10 min, qui permet de saturer les sites de liaisons non-spécifiques en empêchant la formation de liaisons

électrostatiques entre la sonde et le tissu. Après rinçage avec du PBS 1X, les lames sont déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (de 70 à 100%) pour éviter la dilution du milieu d'hybridation. Les lames sont séchées à l'air libre avant hybridation.

## 2. Hybridation

La sonde est dénaturée (95°C, 5 min puis 2 min sur glace) avant d'être mélangée au milieu d'hybridation préchauffé à 54°C. La concentration de sonde requise est de 80 pM pour l'*Aa-nat* et *Icer*, et 400 pM pour *c-fos*. Les différents composants du milieu d'hybridation (tableau 3) permettent de saturer les sites non-spécifiques, d'éviter l'oxydation de la sonde et de diminuer la stringence, le volume aqueux et la température de fusion. Le mélange sonde / milieu est déposé (80 µl) sur les lames, qui sont alors recouvertes d'une lamelle stérile. L'ensemble est ensuite scellé avec une colle pour histologie (DPX, Fluka) et placé au four à 54°C pour une nuit.

	Concentration initiale	Quantité (dans un volume final de 40 ml)	Concentration finale
Formamide désionisé	100%	20 ml	50%
SSC	20x	4 ml	2x
Denhart's	50x	800 µl	1x
ADN de sperme de saumon	10 mg/ml	2 ml	0,5 mg/ml
ARN de transfert	50 mg/ml	200 µl	0.25 mg/ml
Sulfate dextran	100%	4 g	0,1 g/ml

Tableau 3 : Composition du milieu d'hybridation

## 3. Post-hybridation

Les différents traitements de posthybridation permettent de réduire les liaisons non-spécifiques (bruit de fond) par l'utilisation d'une ribonucléase qui digère les ARN monobrinés (sondes non hybridées) et par des bains successifs de stringence croissante. Après avoir

enlevé la colle et les lamelles, les lames sont immédiatement plongées dans une solution de SSC 4X pendant 5 min puis dans des bains de SSC 4X successifs afin d'enlever le maximum de milieu d'hybridation restant. Un traitement par la ribonucléase A [20 µl à 10 mg/ml pour 200ml de tampon ARNase (NaCl 0,5 M, TRIS 10 mM pH 8, EDTA 1 mM)] à 37°C pendant 30 min est alors effectué. Ensuite, les lames sont lavées dans plusieurs bains de stringence croissante: 2 fois 5 min SSC 2X, 2 fois 5 min SSC1X, 5 min SSC 0,5X, 5 min SSC 0,2X, puis un dernier bain de SSC 0.1X de 30 min à 62°C. Les coupes sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool croissant contenant de l'acétate d'ammonium, puis séchées à l'air libre.

#### 4. Autoradiogramme et révélation

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

#### 5. Quantification

Les films sont scannés et l'image est traitée avec le logiciel *Image J* (NIH) en utilisant comme gamme étalon des standards au  $^{14}\text{C}$ . Par coupe, deux mesures de densité optique sont effectuées : une dans la glande pinéale et une autre dans le cerveau (zone d'hybridation "non spécifique"). La soustraction de la moyenne obtenue dans la zone non spécifique de celle de la glande pinéale permet d'obtenir une valeur correspondant à l'hybridation spécifique, donc un niveau relatif d'ARNm hybridé. Pour chaque animal, une moyenne est calculée à partir des mesures obtenues pour trois à six coupes. Pour chaque point horaire, nous avons donc plusieurs valeurs correspondantes aux moyennes obtenues pour chaque animal. Comme la variabilité intra-individuelle est nettement inférieure à la variabilité inter-individuelle, pour chaque point horaire, nous calculons la moyenne de l'ensemble des coupes pour chaque animal.

## IV. Western Blot

### A. Préparation des homogénats et dosage des protéines

Lorsque nous avons commencé à utiliser la technique de Western Blot, que ce soit pour les analyses *in vivo* ou *in vitro*, nous groupions 2 à 3 glandes pinéales par condition expérimentale pour avoir assez de protéines à exploiter. Cette méthode correspond à la première méthode de réalisation des homogénats qui sera décrite. Par la suite, quand nous avons commencé à exploiter les ARNm par RT-PCR pour les expériences *in vitro*, nous voulions exploiter à la fois les ARNm et les protéines sur les mêmes échantillons, afin de diminuer le nombre d'animaux à utiliser. Par ailleurs, nous avons dans ce cas réalisé les extractions des glandes pinéales individualisées, et non groupées afin d'avoir un effet plus reproductible. Ceci correspond à la deuxième méthode d'extraction des protéines décrite.

#### 1. Première méthode

Les homogénats cellulaires sont réalisés dans du tampon Laemmli ("Laemmli Sample Buffer" (LSB) 1X: Tris-HCl 125 mM ; glycérol (ultra pur) 20% ; SDS (sodium dodécyl sulfate) 4% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 10%), qui permet de dénaturer les protéines (élimination des ponts dissulfure, des liaisons hydrogène, etc) et de leur donner une charge négative globale (grâce au SDS). Les glandes sont soniquées sur glace dans le tampon à une fréquence de 40 Hz jusqu'à l'obtention d'une solution homogène (10 à 15 secondes). Les homogénats obtenus sont mis à bouillir pendant 5 min dans un bain-marie (ce qui aide à la dénaturation des protéines), puis centrifugés à 13000 rpm afin d'éliminer les éléments insolubles.

La quantité de protéines contenue dans les homogénats est dosée selon la méthode de Zaman-Verwilghen (Zaman et Verwilghen, 1979). Afin de précipiter le SDS qui interfère avec cette méthode de dosage, 5  $\mu$ l d'homogénat sont mis à incuber 10 min à température ambiante avec 20  $\mu$ l d'eau ultra pure et 225  $\mu$ l de tampon phosphate potassique 100 mM puis centrifugés à 13.000 rpm. Cent microlitres de réactif de Bradford (Bleu de Coomassie G-250 0,01% ; éthanol 95° 4,7% ; acide phosphorique 8,5%) sont ajoutés à 30  $\mu$ l de surnageant, ce qui permet une coloration des protéines avec une intensité proportionnelle à leur quantité (Bradford, 1976). Le rapport des absorbances à 620 et 450 nm est mesuré, puis comparé à ceux obtenus pour des standards réalisés avec de l'albumine (de 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l à 4  $\mu$ g/ $\mu$ l).

### 2. Deuxième méthode

Dans certaines expériences, les ARN et les protéines ont été extraits sur les mêmes échantillons. Pour cela, la première étape consiste à extraire les ARN (voir **section V.A**), puis l'ADN de la phase organique par précipitation à l'éthanol (0,3 ml d'éthanol 100% pour 1 ml de TRI-Reagent); centrifugation 5 min à 2000 rpm à 4°C. Au surnageant contenant les protéines (500 µl), sont alors ajoutés 3 volumes d'acétone, puis après 10 min à température ambiante, les protéines sont sédimentées par centrifugation à 12000 rpm à 4°C. Le culot est lavé 3 fois 10 min dans 1 ml de guanidine hydrochloride 0,3 M-éthanol 95%-glycérol 2,5%. A chaque lavage, le mélange est laissé à température ambiante 10 min puis les protéines sont sédimentées à 8000 rpm à 4°C. Un dernier lavage est réalisé avec une solution d'éthanol 95%-glycérol 2,5% suivi d'une centrifugation de 5 min à 8000 rpm. Le culot de protéines est séché à l'air libre et resuspendu dans du LSB 1X. Les homogénats obtenus sont bouillis 5 min, puis centrifugés à 13000 rpm. Les protéines sont dosées de la même manière que précédemment.

## B. Séparation et immunodétection des protéines

### 1. Electrophorèse et électrotransfert des protéines

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode décrite par Doucet (Doucet *et al.*, 1990). Du Bleu de Bromophénol (1 µl) est ajouté aux homogénats afin de les colorer, puis un volume contenant 10-15 µg de protéines est chargé sur gel de polyacrylamide à 14% dont la composition du gel est donnée dans les tableaux 4 et 5. Le gel est alors placé dans un appareil à électrophorèse (Mini-ProteanII, BioRad®) et recouvert de tampon de migration ("Running Doucet" 1X : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 50 mM ; glycine 150 mM ; SDS 0,1% ; pH 8,3-8,9). Un courant électrique de 30 mA est appliqué pendant environ 1h20.

Les protéines séparées dans le gel de polyacrylamide sont ensuite transférées sur une membrane de difluore de polyvinylidène (PVDF, BioRad®), qui permet une très bonne rétention des protéines en présence de SDS (170-200 µg de protéines/cm<sup>2</sup> de membrane) et offre également une très bonne stabilité mécanique et chimique. Le gel est d'abord équilibré pendant 30 min dans du tampon d'électrotransfert (Towbin 0,5X : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 12,5 mM ; glycine 96 mM ; SDS 0,0125% ; pH 8,3), puis apposé contre une membrane de PVDF, et recouvert de Towbin 0,5X. Un courant électrique de 150 à 300 mA est appliqué du gel vers la membrane pendant 1h30 à 2h30 selon la taille des protéines recherchées. A la fin du transfert, la membrane est lavée 4 fois 5 min dans de l'eau ultra pure.

Solution	Composition	Volume	Concentration finale
<b>Acrylamide 100 :1</b>	Acrylamide 40%, bisacrylamide 1%	1,75 ml	14%
<b>Tampon de séparation 4X</b>	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 400 mM, glycine 1,2 M, glycérol 20%, SDS 1,6%	1,25 ml	1X
<b>TEMED</b>	-----	5 µl	0,001%
<b>Persulfate d'ammonium</b>	-----	50 µl	0,01%
<b>Eau ultrapure</b>	-----	2 ml	-----

**Tableau 4 : Composition du gel de séparation (valeurs pour 1 gel).** Le pourcentage de bisacrylamide est donné en fonction de celui de l'acrylamide.

Solution	Composition	Volume	Concentration finale
<b>Acrylamide</b>	Acrylamide 30%, bisacrylamide 2.67%	800 µl	4%
<b>Tampon de concentration 4X</b>	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 280 mM, EDTA 16 mM, glycérol 20%, SDS 1,6%	1,5 ml	1X
<b>TEMED</b>	-----	20 µl	0,3%
<b>Persulfate d'ammonium</b>	-----	20 µl	0,3%
<b>Eau ultrapure</b>	-----	3,7 ml	-----

**Tableau 5 : Composition du gel de concentration (valeurs pour 2 gels).** Le pourcentage de bisacrylamide est donné en fonction de celui de l'acrylamide.

## 2. Immunodétection des protéines

### a) Immunoblot

La membrane est lavée 4 fois 5 min dans une solution de TBHS 1X-Tween20 0,05%, puis les sites de liaisons aspécifiques sont saturés avec une solution de lait 2% dilué dans du TBS 1X-Tween20 0,05% . Elle est ensuite incubée à température ambiante pendant une nuit avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de TBS 1X-Tween20 0,05%-réactif bloquant 0,25% (Roche)-NaN<sub>3</sub> 0,02%. La liste des anticorps utilisés, leurs caractéristiques et leurs

dilutions sont données dans le tableau 1. Après l'incubation, la membrane est lavée 6 fois 5 min avec du TBHS 1X-Tween20 0,05%, puis incubée pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (Jackson), couplé à la peroxydase de Raifort, dilué au 1/20000 dans une solution de TBS 1X-Tween20 0,05%-Gélatine 0,25%. Finalement, la membrane est lavée 6 fois 10 min dans du TBHS 1X-Tween20 0,05%, puis 2 fois 2 min dans du TBS 1X-Tween20 0,05%.

#### **b) Révélation**

La membrane est incubée avec la solution de révélation (Supersignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) à l'obscurité pendant 5 min. Elle est ensuite placée entre deux feuilles plastiques avec le reste de la solution. Un film photographique est apposé sur l'ensemble, toujours à l'obscurité. La solution de révélation contient du peroxyde d'hydrogène (substrat de la peroxydase) ainsi que du luminol. Lors de la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau par la peroxydase, une réaction d'oxydoréduction se produit et le luminol est dégradé en un composé émettant des photons qui vont impressionner le film. Il y aura présence de bandes noires aux endroits où une activité de la peroxydase a eu lieu, c'est à dire là où se situent les anticorps dirigés contre les protéines recherchées. Le temps d'exposition peut varier de 30 secondes à 2 heures en fonction de la protéine et des anticorps utilisés. Ce délai passé, le film est révélé selon la séquence suivante : 10 min dans une solution de révélateur (Kodak) ; 1 à 2 min dans de l'eau pour rincer ; 5 min dans une solution de fixateur (Ilford Hypam) ; 1 à 2 min dans l'eau.

Après la révélation, les membranes peuvent être réutilisées pour révéler une autre protéine, après avoir décroché les anticorps primaires et secondaires par une élution. Les membranes sont alors lavées 2 fois 2 min dans de l'eau. Elles sont ensuite placées dans du tampon d'élution (glycine 10 mM ; triton X100 0,3% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 50 mM ; pH 2,2) à 50°C pendant 30 min, et enfin lavées abondamment dans de l'eau. Elles peuvent alors être soit conservées dans de l'eau contenant 0,02% de  $\text{NaN}_3$ , soit réutilisées pour un autre immunomarquage. Afin de s'assurer que la méthode assure une bonne élution des anticorps, les contrôles suivants ont été réalisés pour chaque anticorps utilisé : une membrane sans anticorps ré-incubée avec la solution de révélation ; une membrane sans anticorps primaire subissant le même traitement.

### C. Quantification

Les films photographiques obtenus ont été scannés et la densité optique des bandes mesurée avec un logiciel d'analyse d'images (NIH *Image J*). La moyenne de densité optique d'une bande est normalisée par rapport à la valeur obtenue pour CREB ou la tubuline  $\alpha$  (témoins d'expression constitutive) sur la même membrane après élution.

## V. RT-PCR

### A. Extraction des ARNm et synthèse des ADNc

L'extraction est réalisée avec du TRI-Reagent (Fermentas) selon les recommandations du fabricant. Après les expériences de culture, les glandes pinéales congelées (1 par tube) sont directement mises en présence de 600  $\mu$ l de TRI-Reagent, homogénéisées et laissées 5 min à température ambiante. Après ajout de 1/5<sup>e</sup> du volume en chloroforme et mélange, les tubes sont laissés 2 à 3 min à température ambiante, puis centrifugés à 12000 rpm à 4°C. Il se forme alors 3 phases : une phase aqueuse (au dessus) contenant les ARN, une phase intermédiaire et une phase organique contenant les protéines. La phase aqueuse (environ 250  $\mu$ l) est alors récupérée dans un nouveau tube stérile. Pour certaines expériences, les autres phases ont été conservées dans le but d'en extraire les protéines.

A la phase aqueuse sont ajoutés 3  $\mu$ l d'une solution de glycogène ultrapur à 5  $\mu$ g/ $\mu$ l et 400  $\mu$ l d'isopropanol. L'isopropanol permet de précipiter les ARN et le glycogène sert de "porteur", assurant une meilleure précipitation. Le mélange est laissé 10 min à température ambiante, puis centrifugé 10 min à 12000 rpm à 4°C. Les ARN précipitent alors sous forme de petites masses gélatineuses qui apparaissent blanchâtre grâce au glycogène. Après centrifugation, le surnageant est enlevé et le culot est lavé dans de l'éthanol à 70°. Le mélange est alors centrifugé 5 min à 12000 rpm à 4°C, puis le surnageant est enlevé et le culot est séché à l'air libre (5 à 10 min). Une fois sec, le culot est resuspendu dans 24  $\mu$ l d'eau ultrapure. Les ARN dilués sont incubés 10 min à 55°C, puis la concentration est déterminée par spectrométrie.

La transcription inverse des ARNm est réalisée avec le kit Omniscript RT (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les 24  $\mu$ l de solution d'ARN obtenus sont mis en présence de 6  $\mu$ l d'un mélange réactionnel détaillé dans le tableau 6, puis incubés 1 h à 37°C. Après cela, la réaction est stoppée en incubant les tubes 5 min à 95°C. La solution d'ADNc ainsi obtenue est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

	Concentration stock	Volume	Concentration finale
<b>Tampon</b>	10 X	1,5 µl	0,5 X
<b>dNTPs</b>	5 mM chacun	1,5 µl	0,25 mM chacun
<b>Amorce (oligonucléotide composé de 18 T)</b>	10 µM	1,5 µl	0,5 µM
<b>Inhibiteur d'ARNase</b>	10 U/µl	0,75 µl	7,5 U (pour 30 µl de réaction)
<b>Omniscript RT</b>	4 U/µl	0,75 µl	3 U (pour 30 µl de réaction)

**Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel pour la transcription inverse**

## B. PCR et détection

L'amplification par PCR se déroule dans le mélange réactionnel détaillé dans le tableau 7. Elle se déroule suivant la séquence suivante : 1 min de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation des amorces à 63°C et enfin 1 min d'extension à 72°C. La dénaturation initiale et l'extension finale sont de 5 min chacune. Le nombre de cycles utilisé pour chaque couple d'amorces est donné dans le tableau 8. Toutes les réactions incluent un témoin négatif réalisé avec de l'eau à la place de l'échantillon. La séquence des amorces a été déterminée à l'aide du logiciel libre "Primer 3" disponible sur internet (Rozen & Skaletsky, 2000) en utilisant les séquences d'ADNc de hamster, sauf *Icer* pour lequel la séquence de rat a été utilisée. Les séquences sont données dans le tableau 8.

Les ADNc amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse (80 V ; 50 mA) sur gel d'agarose 1,5 % (agarose 0,8 g ; 50 ml TBE 1X ; 1 µl bromure d'éthidium 10 mg/ml) pendant 1 heure dans du TBE 1X. L'ADN est visualisé sous lumière UV à 254 nm et une image numérique du gel est prise. L'intensité des bandes observées est quantifiée selon la même méthode que pour les films de Western-Blot. Dans ce cas, le témoin d'expression constitutive utilisé est la *Gapdh*.

	Concentration stock	Volume	Concentration finale
<b>Echantillon</b>	-----	1 µl	-----
<b>Tampon (Fermentas)</b>	10 X	3 µl	1 X
<b>dNTPs</b>	2,5 mM chaque	1,2 µl	0,1 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,8 µl	1,5 mM
<b>amorces</b>	30 µM	1 µl de chaque	1 µM
<b>TAQ polymérase</b>	5 U/µl	0,2 µl	1 U/réaction
<b>Eau stérile</b>	-----	qsp 30 µl	-----

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel pour les réactions de PCR

	amorces	Fragment amplifié	Taille (nucléotides)	Nombre de cycles
<b><i>Aa-nat</i></b>	Gauche: 5'-TCTGTCTCCGGTACCTGTCC-3' Droit: 5'-AGGTATCGCCACAGCAAGAC-3'	172-431 AF092100 hamster	260	30
<b><i>c-fos</i></b>	Gauche: 5'-GGAGGAGAAACGGAGAATCC-3' Droit: 5'-CAGGGAAGCCACAAACATCT-3'	408-663 AF061881 hamster	256	25
<b><i>Icer</i></b>	Gauche: 5'-TGGCTGTAAGTGGAGATGAAACT-3' Droit: 5'-AGCAGCTTCCCTGTTTTTCA-3'	59-285 NM017334 rat	227	25
<b><i>Gapdh</i></b>	Gauche: 5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3' Droit: 5'-TCACTCTTGAAGTCGCAGGA-3'	575-830 U10983 hamster	256	22

Tableau 8 : Caractéristiques des amorces utilisées pour les réactions de PCR

## VI. Analyses statistiques

Les analyses statistiques consistent en des ANOVA à un ou deux facteurs selon l'expérience, suivies d'un test de comparaisons multiples de Tukey. Les différences sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ . Pour chaque condition spécifique, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des valeurs de 3 à 6 animaux. Pour les expériences de culture, où il n'y avait que de 2 glandes pinéales par condition, aucune analyse statistique n'a été réalisée.

# *Résultats*



Cette partie est dédiée à la présentation des résultats obtenus dans le cadre de mon projet de thèse. La plus grande partie sera présentée sous la forme d'un article publié et d'un article soumis. D'autres résultats seront présentés comme des données complémentaires non publiées et apportant quelques éclaircissements quant aux mécanismes décrits dans les articles. Ces résultats complémentaires pouvant servir à la fois aux deux articles, ceux-ci seront discutés au fur et à mesure de leur description.

Cette section est organisée en trois parties. La première traite spécifiquement de la régulation noradrénergique des protéines AP-1 et de pCREB et de leur intervention dans la régulation de la synthèse nocturne de l'*Aa-nat*, chez le hamster, mais également chez le rat. La seconde traite à la fois des mécanismes de la restriction diurne et photopériodique de l'expression de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien en condition *in vivo*, en particulier du rôle d'ICER dans ces deux phénomènes. La troisième partie présente des études préliminaires qui traitent de la restriction diurne dans des glandes pinéales en culture. Ces dernières expériences ont été réalisées dans le but d'étudier ce phénomène sous un autre angle, le modèle *in vivo* ayant maintenant atteint ses limites en termes de compréhension des mécanismes moléculaires associés.

## **I. Expression et rôle des facteurs AP-1 et de pCREB dans la glande pinéale du hamster syrien**

### **A. Introduction**

La synthèse de mélatonine chez le hamster syrien, tout comme chez le rat, est strictement régulée d'un point de vue transcriptionnel. Cependant, l'analyse précise de cette régulation révèle des différences majeures entre les deux espèces, essentiellement dans l'initiation de la transcription de l'*Aa-nat*. En effet, le délai d'induction de l'*Aa-nat* est de 5 à 6 heures chez le hamster, alors qu'il est de 3 à 4 heures chez le rat. Cette différence semble être la conséquence directe de l'intervention de facteur de transcription synthétisés en début de nuit chez le hamster (Garidou *et al.*, 2003b). Dans cette partie, nous avons voulu caractériser ces facteurs de transcription et étudier leur rôle potentiel dans la synthèse de mélatonine.

Les protéines du complexe AP-1 sont des facteurs de transcription interagissant entre eux pour former différents dimères plus ou moins actifs dans l'initiation de la transcription. L'expression de ces facteurs a été bien décrite dans la glande pinéale de rat et il semblerait qu'ils n'interviennent pas directement dans le contrôle de la transcription de l'*Aa-nat* chez cette espèce. Cependant, vu le caractère précoce de l'expression de ces facteurs, nous avons cherché à savoir si leur intervention pouvait expliquer la différence existant entre l'initiation de la synthèse de mélatonine chez le rat et le hamster. Dans ce but, nous avons étudié l'expression rythmique de ces facteurs, spécialement c-FOS, c-JUN et JUN-B, ainsi que leur régulation dans la glande pinéale de hamster. En parallèle, nous avons également caractérisé l'expression et la régulation du facteur de transcription CREB afin de définir son rôle potentiel dans la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont présentés sous la forme d'un article publié et de quelques données complémentaires.

### **B. Article 1 publié dans *Endocrinology* en 2006**

**« L'expression différentielle des protéines AP-1 dans la glande pinéale du hamster syrien et du rat peut expliquer les variations spécifiques observées dans l'expression du gène de l'*Aa-nat*. »**

Signalement bibliographique ajouté par le :

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Differential expression of activator protein-1 proteins in the pineal gland of Syrian hamster and rat may explain species diversity in arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression**

Natalia SINITSKAYA, Anthony SALINGRE, Paul KLOSEN, Florent G. REVEL, Paul PEVET and Valérie SIMONNEAUX

**Endocrinology, 2006, vol. 147, n° 11, pages 5052-5060**

*Copyright © 2006 by The Endocrine Society*

**Pages 166-... :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-0526>

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

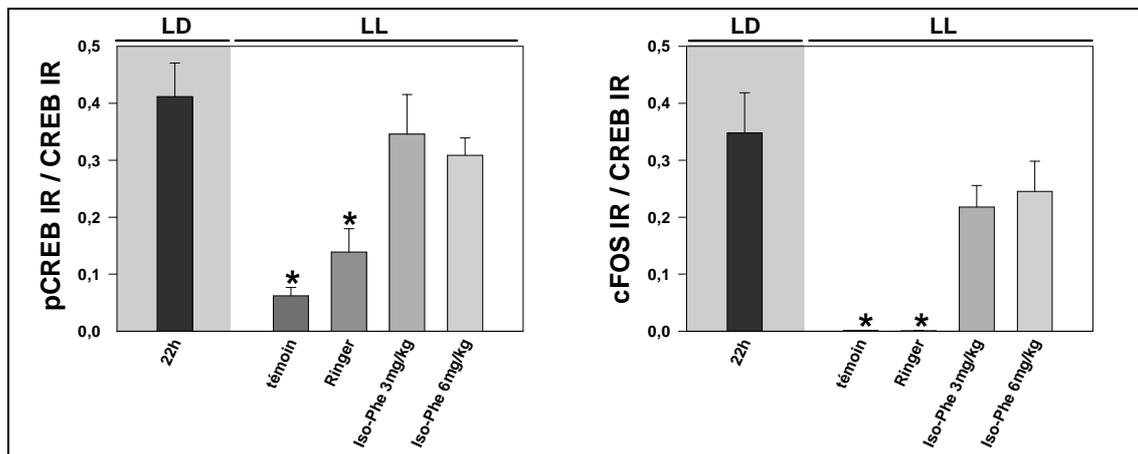
<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>



### C. Résultats complémentaires

#### 1. Régulation noradrénergique de c-FOS et de pCREB : induction par des agonistes adrénergiques en début de nuit subjective chez des animaux maintenus en LL.

Cette expérience a été réalisée dans le but de caractériser la régulation de l'expression des protéines pCREB et c-FOS en début de nuit dans la glande pinéale du hamster syrien. Elle vient en complément de **l'expérience n°2 de l'article 1** qui consistait en l'étude de l'effet de l'injection d'antagonistes adrénergiques sur l'expression de ces deux facteurs. Par ailleurs, cette expérience nous a également permis de définir les doses d'agonistes adrénergiques à utiliser dans l'étude sur la restriction diurne de ces deux facteurs dans **l'article 1 et 2**.



**Figure 29 : Induction de l'expression des protéines pCREB et c-FOS en début de nuit dans la glande pinéale de hamsters syrien maintenus en LL.** Pour cette expérience 4 groupes d'animaux, préalablement acclimatés en LD 14:10 (lumière de 05h à 19h), ont été maintenus en lumière constante (LL) en début de nuit. Trois groupes ont été injectés à 20h (1h après le début de la nuit subjective) avec soit une solution de Ringer, soit une solution d'isoprotérénol/phényléphrine à 3 mg/kg ou 6 mg/kg, puis sacrifiés à 22h (3h après le début de la nuit subjective). En parallèle, un groupe maintenu en LD et un groupe maintenu en LL, ne recevant aucune injection, ont été sacrifiés à 22h pour servir respectivement de témoin positif et négatif d'expression. A 22h, les animaux ont été sacrifiés et préparés pour l'immunohistochimie pour CREB, pCREB et c-FOS selon le protocole expliqué dans la partie Matériel et Méthodes. Les données obtenues pour l'immunoréactivité de pCREB et c-FOS sont présentées comme le ratio entre les TID/ $\mu\text{m}^2$  de ces deux facteurs et le TID/ $\mu\text{m}^2$  obtenu pour CREB sur des coupes adjacentes. Chaque condition est la moyenne  $\pm$  SEM de 4 à 5 animaux. \* $p < 0,05$  comparée au témoin positif en LD (ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaisons multiples de TUKEY).

L'inhibition de la libération de la NA en début de nuit par la lumière (LL) inhibe l'augmentation de l'expression endogène de pCREB et de c-FOS (**figure 29**) normalement observée 3h après le début de la nuit en LD. Cette expression est réinduite par les injections exogènes d'agonistes adrénergiques (Iso/Phe), à des niveaux équivalents à la condition LD. L'expression observée pour ces deux facteurs est maximale pour les deux doses utilisées. Cependant, il est probable que l'injection en elle-même puisse causer un léger stress aux animaux en LL, et ainsi augmenter légèrement l'expression de pCREB, car les animaux injectés au Ringer montrent une légère augmentation de l'expression de celui-ci.

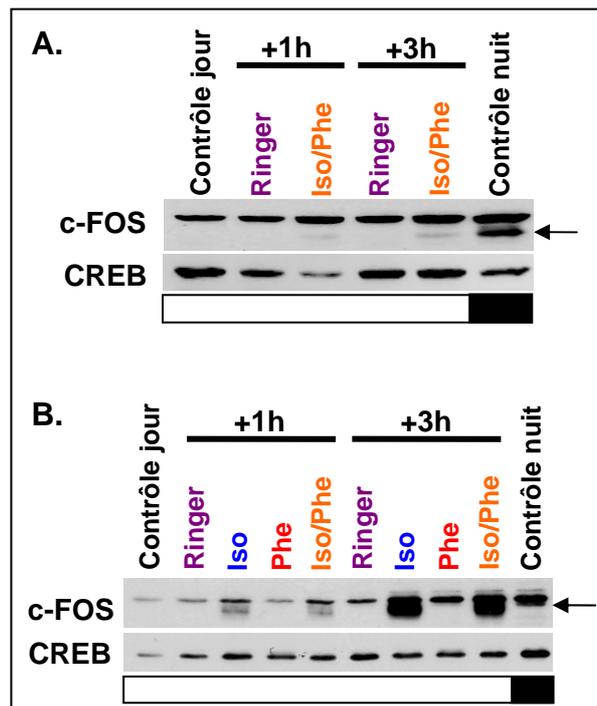
Grâce à cette expérience, en complément de l'expérience n°2 de l'article 1, nous voyons que pCREB et c-FOS sont induits en début de nuit par des agonistes adrénergiques, et donc par la libération endogène de NA sur la glande pinéale. Suite à cette expérience, nous avons débuté l'étude sur l'induction de ces deux facteurs par des agonistes adrénergiques de jour dans la glande pinéale du hamster syrien dans le but de décrypter les mécanismes responsables de la restriction diurne de la synthèse de mélatonine chez cette espèce. Pour cela un protocole d'injections de jour a été défini, en utilisant la dose minimale d'agonistes adrénergique de 3 mg/kg.

## **2. Régulation noradrénergique de c-FOS : induction par des agonistes adrénergiques en milieu de jour/ jour subjectif en LD et suite à 3 jours en LL.**

Ces expériences peuvent être utilisées en complément de l'article 1 et de l'article 2. Leur but est de caractériser l'induction de la protéine c-FOS en milieu de jour/jour subjectif en LD et en LL. La **figure 30A** montre tout d'abord que l'induction de c-FOS par des agonistes adrénergiques est très faible, en milieu de jour en LD, suggérant donc une restriction temporelle de son induction tout comme pour l'*Aa-nat*. Cependant, cette induction est possible lorsque les animaux ont été maintenus en LL durant 3 jours (**figure 30B**). Ceci peut venir d'une hypersensibilité des récepteurs causée par l'inhibition de la libération endogène de NA par la lumière constante. Néanmoins, cette condition nous a permis d'analyser si l'induction de c-FOS dépendait de la stimulation  $\alpha$ - et/ou  $\beta$ -adrénergique. Il apparaît sur la **figure 30B** que la stimulation par l'isoprotérénol est nécessaire et suffisante à l'induction de c-FOS après 3 jours en LL, alors que dans cette condition, la stimulation  $\alpha$ -adrénergique est inefficace.

Ceci suggère que l'inhibition de l'expression de c-FOS en début de nuit par la prazosine (**expérience 2 de l'article 1**) n'est pas due à une inhibition directe de la synthèse de c-FOS par la voie  $\alpha$ -adrénergique, mais plutôt par une inhibition de la potentialisation de la voie  $\beta$ -

adrénergique. Cependant, dans l'expérience décrite ici, aucun effet potentialisateur sur l'induction de c-FOS n'a pu être observé (conditions Iso et Iso/Phe similaires). Il est possible que l'effet de la lumière constante sur l'hypersensibilité des récepteurs soit plus important dans le cas des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques que des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques chez le hamster, expliquant ainsi l'absence d'effet de la stimulation  $\alpha$ -adrénergique.



**Figure 30 : Induction de l'expression de la protéine c-FOS en milieu de jour/jour subjectif dans la glande pinéale de hamsters syrien en LD et après 3 jours en LL.** (A) Les hamsters maintenus en LD ont été injectés en milieu de jour (12h) avec une solution d'isoprotérénol/phényléphrine (Iso/Phe ; 3 mg/kg) ou de Ringer et les glandes pinéales ont été prélevées 1 heure ou 3 heures après l'injection. (B) Les animaux ont été maintenus en LL 3 jours avant le début de l'expérience. Le jour de l'expérience, ils ont été injectés en milieu de jour subjectif (12h) avec soit une solution d'isoprotérénol (Iso ; 3 mg/kg), de phényléphrine (Phe ; 3 mg/kg), d'un mélange des deux (Iso/Phe, 3 mg/kg chacun) ou de Ringer, puis les glandes pinéales ont été prélevées 1 heure ou 3 heures après l'injection. Dans les deux expériences, 2 groupes d'animaux ont été sacrifiés au moment de l'injection et à 22h et constituent respectivement des témoins d'expression de jour et de nuit. Pour chaque condition, 2 à 3 glandes ont été groupées dans un même tube pour obtenir une quantité de protéines exploitable. Les prélèvements, la réalisation des homogénats et les western blots pour c-FOS et CREB ont été effectués selon le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (méthode 1 pour les homogénats). Chaque expérience a été reproduite 2 fois, avec des résultats similaires.

## **II. Restriction diurne et régulation photopériodique de l'expression de l'Aa-nat dans la glande pinéale de hamster syrien**

### **A. Introduction**

La deuxième caractéristique de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien est l'incapacité à stimuler celle-ci de manière exogène par des injections d'agonistes adrénergiques durant la phase diurne du nyctémère. Cette restriction de la synthèse de mélatonine est directement liée à la restriction de l'induction de l'Aa-nat, vu que celle-ci ne peut pas non plus être stimulée par des injections diurnes d'agonistes adrénergiques. Cependant, l'utilisation du gène de l'Aa-nat en tant que marqueur d'activation de la glande pinéale est difficile, essentiellement à cause du long délai nécessaire à son induction. Dans **l'article 1**, nous avons caractérisé la régulation de c-FOS et mis en évidence son expression précoce suite à une stimulation noradrénergique. Nous avons donc suivi l'expression du gène *c-fos* (ARNm et protéine) en tant que marqueur de l'activation de la glande pinéale.

Des études précédentes ont suggéré l'intervention d'un facteur de transcription inhibiteur, présent et actif durant le jour, et responsable de l'inhibition diurne de la transcription de l'Aa-nat. Connaissant le rôle majeur d'ICER dans l'inhibition de la transcription des gènes dépendant de l'AMPC, nous avons étudié le profil d'expression de cette protéine dans la glande pinéale du hamster syrien. Son expression élevée durant le jour pourrait expliquer l'impossibilité d'induire l'Aa-nat, ainsi que les autres gènes dépendants de l'AMPC.

Nous avons également envisagé l'hypothèse que la restriction diurne de l'induction de l'Aa-nat soit due à un blocage de la voie de signalisation noradrénergique. Dans ce but, nous avons étudié le profil d'activation de cette signalisation, en utilisant l'induction de pCREB comme marqueur.

### **B. Article 2 en cours de publication dans *Journal of Neuroendocrinology***

**« Blocage diurne de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale du hamster syrien »**

Signalement bibliographique ajouté par le :

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Daytime gating in the Syrian hamster pineal gland**

Anthony SALINGRE, Paul KLOSEN, Paul PEVET and Valérie SIMONNEAUX

**Journal of Neuroendocrinology, published online : 22 Jun 2009**

© 2009 Blackwell Publishing

**Pages 120-... :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01897.x>

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

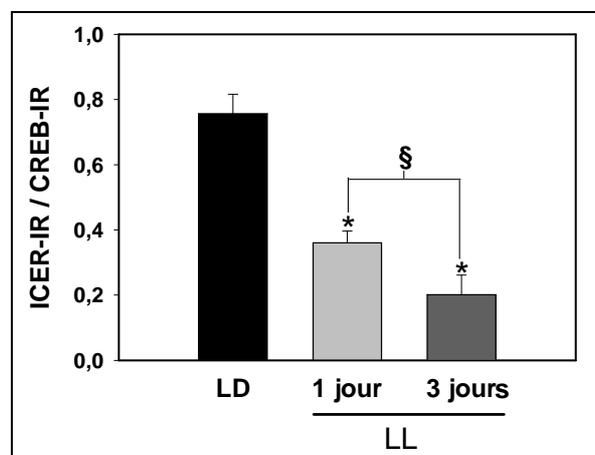
<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

### C. Résultats complémentaires

#### 1. Expression diurne de la protéine ICER après 1 ou 3 jours en LL

Afin de déterminer si l'induction diurne de *c-fos*, *Icer* et l'*Aa-nat* après 1 ou 3 jours en LL (**article 2**, expériences précédentes, Garidou *et al.*, 2003) est due à une diminution de l'expression d'ICER dans la glande pinéale (qui lèverait l'inhibition sur les séquences CRE des promoteurs), nous avons étudié la quantité de protéine ICER présente en milieu de jour subjectif dans la glande pinéale de hamster syrien suite à 1 ou 3 jours en LL (**figure 31**).

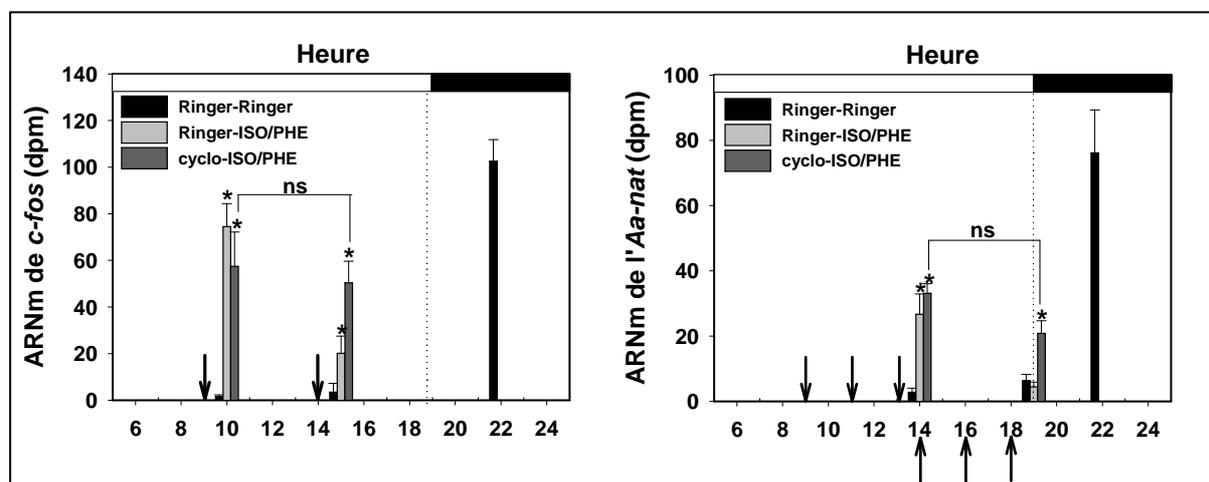
Après un jour en LL, les niveaux d'ICER en milieu de jour (à 14h) sont diminués d'environ 50% par rapport à ceux observés en LD. Après 3 jours en LL, les niveaux sont encore diminués et atteignent environ 35% des niveaux en LD. Il apparaît donc que l'inhibition de la libération endogène de NA sur la glande pinéale durant la nuit inhibe la formation de la protéine ICER, qui diminue fortement après seulement une nuit en LL. Cette diminution pourrait expliquer pourquoi il est possible d'induire *c-fos*, *Icer* et l'*Aa-nat* en LL. En effet, la diminution de la quantité de protéines ICER diminuerait ainsi l'inhibition des sites CRE des promoteurs des gènes qui deviendraient alors accessibles à pCREB.



**Figure 31 : Expression de la protéine ICER en milieu de jour subjectif en LL dans la glande pinéale de hamster syrien.** Les animaux, préalablement acclimatés en LD 14:10, ont été soit maintenus en LD, soit placés en LL durant 1 ou 3 jours. Le jour du prélèvement, ils ont été perfusés à 14h avec la solution de fixateur et les cerveaux ont été prélevés et traités pour l'immunohistochimie pour ICER et CREB conformément au protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes. Les données sont présentées comme le ratio entre le marquage ICER et le marquage CREB (ICER-IR/CREB-IR) et chaque point est la moyenne  $\pm$  SEM de 4 animaux. \* $p < 0,05$  comparée à la condition LD (ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de comparaisons multiples).  $^{\S} p < 0,05$  entre les deux conditions en LL.

## 2. Effet d'une injection nocturne de cycloheximide sur l'induction diurne de *c-fos* et de l'Aa-nat par des agonistes adrénergiques.

Suite à la découverte de la fenêtre de restriction d'activité transcriptionnelle dans la glande pinéale, nous avons voulu savoir si celle-ci dépendait d'une synthèse nocturne de protéine(s) inhibitrice(s). Dans ce but, des animaux ont été injectés avec de la cycloheximide la nuit précédant l'expérience, puis injectés en début ou en fin de jour avec des agonistes adrénergiques (**figure 32**). Nous avons réalisé cette expérience uniquement pour *c-fos* (injection unique) et pour l'Aa-nat (injections chroniques d'une durée de 5 heures).



**Figure 32 : Effet de l'inhibition de la synthèse protéique nocturne sur l'induction différentielle diurne des ARNm de *c-fos* (A) et de l'Aa-nat (B) par des agonistes adrénergiques dans la glande pinéale de hamster syrien.** Les animaux acclimatés en LD 14:10 ont été injectés à 02h (7h après le début de la nuit) avec soit une solution de Ringer, soit une solution de cycloheximide (cyclo, 30 mg/kg). Le jour suivant, ils ont reçu soit une injection aiguë de Ringer ou d'isoprotérénol/phényléphrine (Iso/Phe ; 3mg/kg) à 09h ou 14h (A), soit 3 injections de Ringer ou d'Iso/Phe (3mg/kg) séparées de 2h, la première étant à 09h ou 14h (B). Ils ont ensuite été sacrifiés soit 1h après l'injection aiguë (A) soit 5h après la première injection (B). Les cerveaux ont alors été récupérés et préparés pour l'hybridation *in situ* pour *c-fos* (A) ou l'Aa-nat (B) selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Chaque point est la moyenne  $\pm$  SEM de 5-6 animaux. \* $p < 0,05$  comparée à la condition Ringer pour chaque point horaire. ns : la différence observée entre les deux conditions n'est pas significative.

Cette expérience confirme les résultats obtenus dans l'article 2, à savoir que *c-fos* et l'*Aa-nat* sont inductibles en première partie de journée et pas ou peu en deuxième partie ( $p < 0,05$  dans les deux cas). L'injection de cycloheximide en milieu de nuit précédente abolit cette fenêtre de restriction, puisque dans les deux cas, l'induction des gènes est possible en deuxième partie de journée. De plus l'induction en première partie de journée est toujours visible et à des niveaux équivalents à ceux obtenus lorsque les animaux sont injectés avec une solution de solvant durant la nuit ( $p > 0,05$ ).

Les niveaux obtenus en deuxième partie de journée chez les animaux injectés avec la cycloheximide sont équivalents à ceux obtenus en première partie de journée ( $p > 0,05$ ). Néanmoins, dans le cas de l'*Aa-nat*, les niveaux obtenus dans toutes les conditions sont statistiquement plus bas que ceux des témoins de nuit.

Cette expérience suggère qu'une ou plusieurs protéines inhibitrices, synthétisées en deuxième partie de nuit, pourraient être responsables de la mise en place de la fenêtre temporelle de restriction de l'activation de la glande pinéale durant le jour. Cependant, la cycloheximide étant injectée de façon systémique, il est tout à fait probable que l'effet observé soit dû à une action de celle-ci en dehors de la glande pinéale (sur l'horloge par exemple).

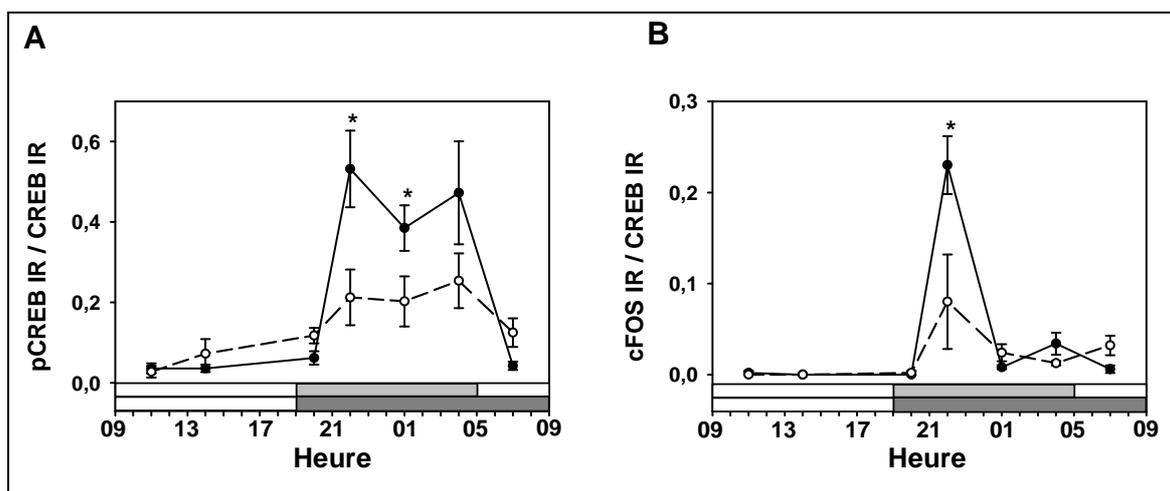
### 3. Expression photopériodique des protéines c-FOS et pCREB

Dans la dernière partie de l'article 2, nous avons étudié le profil photopériodique d'ICER dans la glande pinéale du hamster syrien. Cette expérience nous a permis de démontrer que l'expression d'ICER ne varie pas en fonction de la photopériode, et donc que la diminution de l'expression de l'*Aa-nat* en photopériode courte ne peut pas être expliquée par une augmentation de l'expression de ce facteur de transcription inhibiteur. Suite à ce résultat, nous avons étudié l'expression photopériodique de pCREB et de c-FOS dans le but de déterminer si la sensibilité de la voie de signalisation noradrénergique variait en fonction de la photopériode (**figure 33**).

Les résultats confirment tout d'abord ceux obtenus dans l'**article 1** : une expression forte et prolongée durant toute la nuit pour pCREB et une augmentation rapide et transitoire de c-FOS 3h après le début de la nuit en photopériode longue. Contrairement à ce que nous avons observé pour ICER, les profils journaliers de c-FOS et pCREB diffèrent selon la photopériode. Le profil temporel de c-FOS est similaire en photopériode courte et en photopériode longue : son expression augmente rapidement dès 3 heures après le début de la nuit et diminue

rapidement selon le même déroulement temporel qu'en photopériode longue. Cependant, le maximum atteint est différent et est environ divisé par trois en photopériode courte par rapport à la photopériode longue. Le profil temporel d'induction de pCREB est également similaire dans les deux photopériodes (rapide en début de nuit), mais le maximum atteint est diminué de moitié à 22h et 01h par rapport à la photopériode longue (pas de différence pour le point de 04h). Le profil de diminution en fin de nuit est différent dans les deux photopériodes : l'expression diminue bien avant la fin de la nuit en photopériode courte (07h), alors qu'elle diminue avec l'arrivée de la lumière en photopériode longue. La durée du pic nocturne est similaire dans les deux photopériodes (pas de différence significative au point de 07h).

Ces résultats montrent une diminution générale (pCREB, c-FOS, *Aa-nat*) de l'activité nocturne de la glande pinéale en photopériode courte par rapport à la photopériode longue.



**Figure 33 : Profil d'expression photopériodique des protéines pCREB et c-FOS dans la glande pinéale de hamster syrien.** Les animaux acclimatés en LD 14:10 ont été soit maintenus en photopériode longue (ronds noirs) soit placés en photopériode courte (LD 10:14, ronds blancs) pendant une période de 10 semaines. Après cette période, ils sont répartis aléatoirement en 8 groupes dans chaque photopériode et sacrifiés aux points horaires indiqués. Les cerveaux sont alors préparés pour l'immunohistochimie pour CREB, pCREB et c-FOS selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Les données obtenues pour l'immunoréactivité de pCREB et c-FOS sont présentées comme le ratio entre les TID/ $\mu\text{m}^2$  de ces deux facteurs et le TID/ $\mu\text{m}^2$  obtenu pour CREB sur des coupes adjacentes. Chaque condition est la moyenne  $\pm$  SEM de 4 à 5 animaux. \* $p < 0,05$  pour un même point horaire entre les photopériodes longue et courte (ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples de TUKEY).

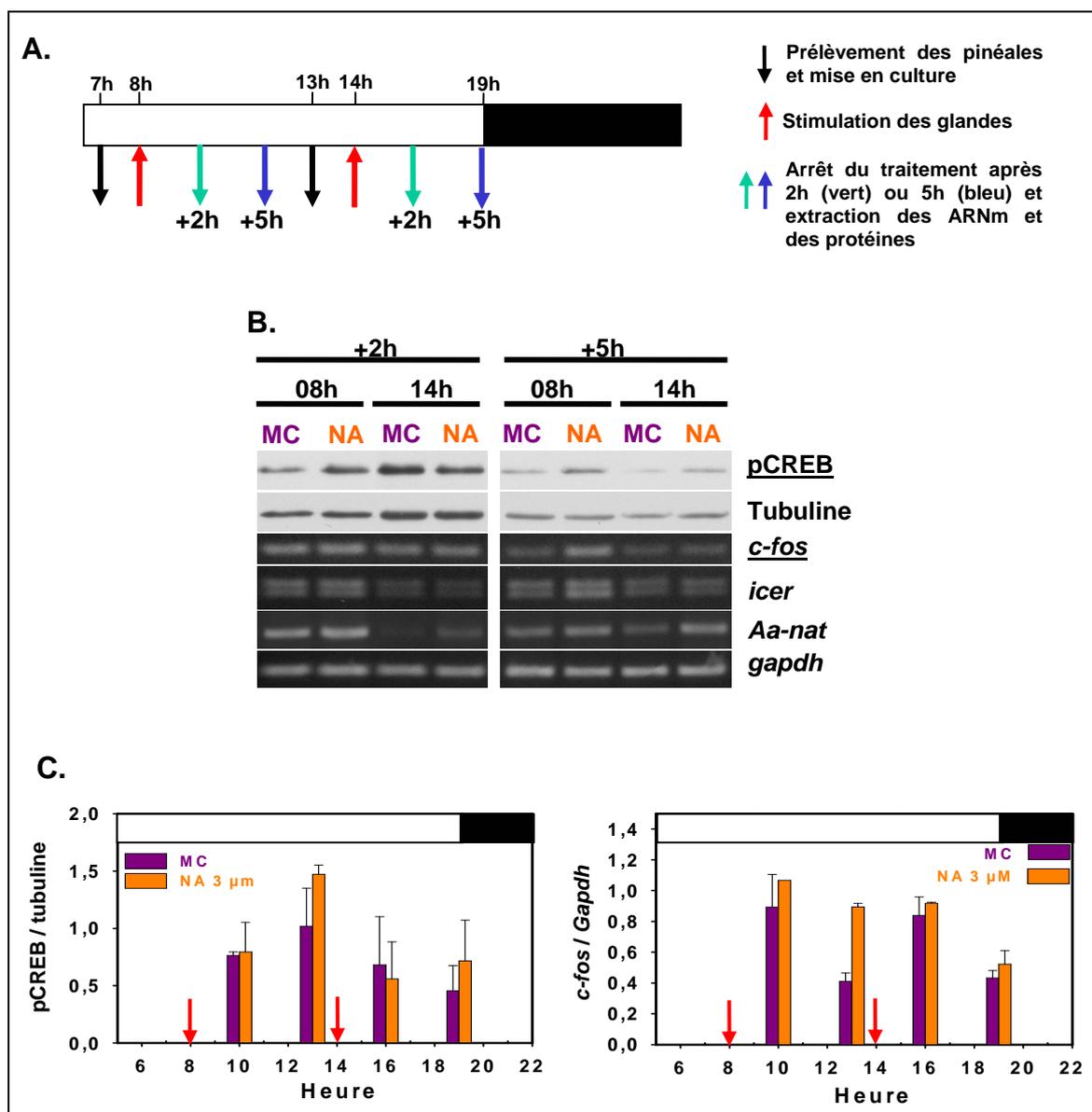
### III. Etudes *ex vivo* de la restriction temporelle de l'induction de l'ARN de l'*Aa-nat* et de la voie de signalisation noradrénergique : mise au point d'un modèle d'étude ?

#### A. Introduction

Nous avons mis en évidence la présence d'une fenêtre de restriction diurne de l'activation de la glande pinéale chez le hamster syrien dans des conditions *in vivo*. Nos données suggérant un blocage de la voie de signalisation adrénérgique en deuxième partie de journée, il apparaissait nécessaire de déterminer précisément le niveau auquel se met en place cette restriction. Bien que quelques paramètres puissent encore être étudiés *in vivo*, comme l'expression des récepteurs adrénérgiques ou de la PKA, il est apparu que ce modèle avait atteint ses limites pour une telle analyse. Nous avons donc envisagé de faire cette étude sur des glandes pinéales *ex vivo*, ce qui permettrait d'activer spécifiquement les différents acteurs de cette signalisation.

Nous avons également essayé de reproduire artificiellement la fenêtre de restriction temporelle, afin de déterminer si celle-ci est interne à la glande pinéale ou induite par un signal externe tel la libération de NA. Un tel modèle permettrait d'étudier le rôle précis de certaines protéines dans ce mécanisme, en réalisant des études de sur- ou de sous-expression. C'est pourquoi j'ai anticipé cette voie d'analyse en effectuant un séjour de 3 mois dans le laboratoire du Pr. Anthony HO et du Pr. Constance CHIK, à Edmonton (Canada), au cours duquel j'ai réalisé la construction d'adénovirus recombinants permettant de réaliser des sur- et des sous-expressions de la protéine ICER chez le rat et le hamster (que nous n'avons pas encore pu utiliser).

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie ne constitue qu'une étude préliminaire qu'il faudra absolument compléter, car elle est nécessaire dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à la mise en place de cette fenêtre de restriction diurne de l'activation générale de la glande pinéale chez le hamster syrien.



**Figure 34 : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueurs d'activation de la glande pinéale de hamster syrien *ex vivo*.** (A) Les glandes pinéales de hamsters syriens acclimatés en LD 14:10 ont été prélevées à 07h ou à 13h, puis mises en culture sous atmosphère 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Après 1 heure de culture, les glandes (2 par condition) sont stimulées soit avec du milieu de culture (MC) soit avec de la noradrénaline (NA, 3 μM) pendant 2 ou 5 heures (le MC et la NA ont été supplémentés en acide ascorbique (100 mg/L) afin d'éviter l'oxydation de la NA). A la fin de la stimulation, chaque pinéale est prélevée et congelée, puis les ARNm et les protéines sont extraits selon le protocole détaillé dans la section Matériels et Méthodes. L'expression de pCREB et de la tubuline est alors étudiée par Western blot, et celle de *c-fos*, *Icer*, l'*Aa-nat* et la *Gapdh* par RT-PCR (B). En (C) sont présentés des exemples de quantification des signaux obtenus pour pCREB et *c-fos*, rapportés respectivement à la tubuline et à la *Gapdh*.

## B. Restriction temporelle de l'induction de *c-fos*, *Icer*, l'*Aa-nat* et de pCREB dans des glandes pinéales en culture *ex vivo*

Cette expérience est la dernière d'une longue série d'expériences de mise au point, réalisées afin d'étudier l'induction de pCREB, *c-fos*, *Icer* et l'*Aa-nat* dans des glandes pinéales en culture. Le but était ici d'étudier la fenêtre temporelle de restriction sur des glandes pinéales prélevées puis mises en culture en première et deuxième partie de journée, afin de pouvoir par la suite stimuler séparément les différents acteurs de la signalisation adrénergique. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 34**. Il est tout d'abord possible de remarquer que l'incubation avec le MC seul pendant 2 heures cause une stimulation des différents paramètres comparable à celle obtenue avec la NA. Ceci est le plus gros problème auquel nous avons dû faire face lors de ces expériences. En effet, il semble que le prélèvement des glandes pinéales en lui-même soit suffisant pour induire les différents acteurs choisis. Cette stimulation pourrait être due à la libération "endogène" de NA causée par la rupture des fibres sympathiques lors de la dissection. Cependant, cet effet semble moins important pour les glandes pinéales prélevées en deuxième partie de journée (à 13h), excepté pour *c-FOS*.

Après 5 heures de stimulation, l'effet du prélèvement est moins important, et il est ici possible de voir une différence entre les conditions MC et NA. Les glandes pinéales prélevées à 08h et stimulées avec la NA présentent ici une induction de pCREB, *c-fos* et *Icer* plus élevée que dans la condition MC 08h. De plus la fenêtre de restriction d'induction semble être reproduite ici, vu que l'induction de pCREB, *c-fos* et *Icer* n'est pas possible dans les glandes pinéales prélevées à 14h (aucune différence entre les conditions MC et NA). Aucune différence n'a été observée pour l'*Aa-nat*.

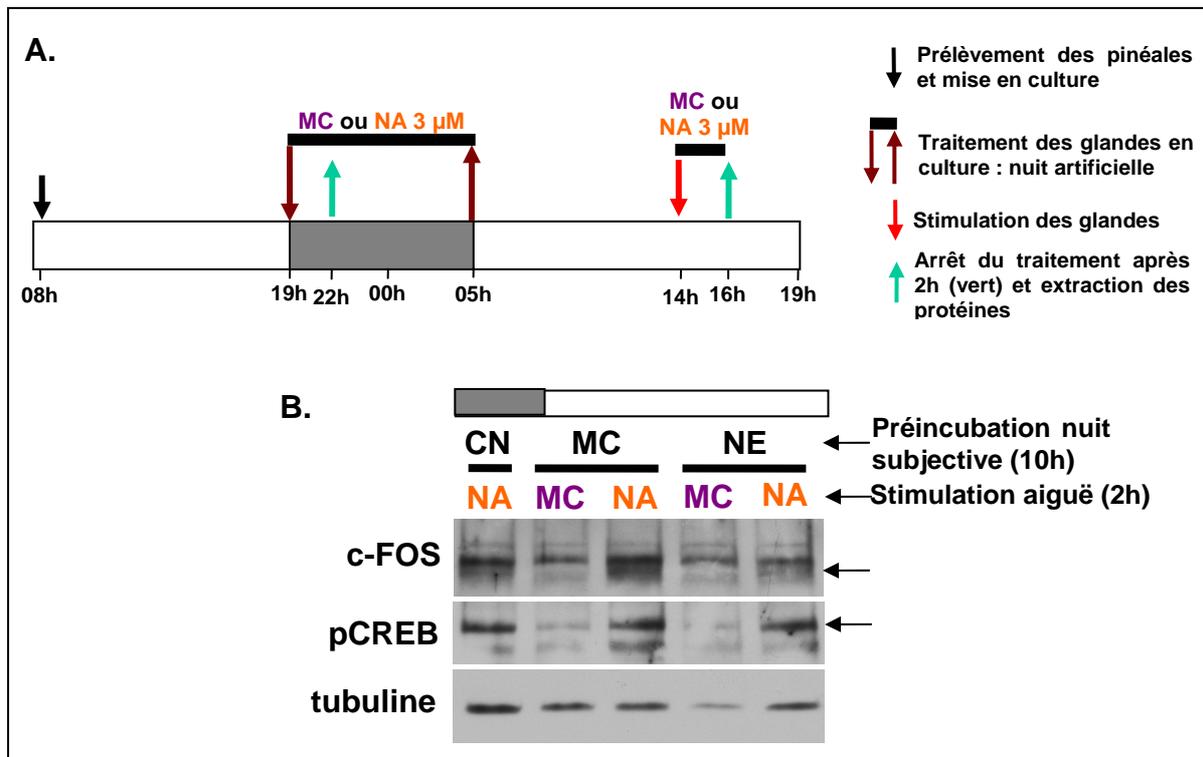
Ces résultats sont donc encourageants en ce qui concerne pCREB, *c-fos* et *Icer*, et confirment les résultats obtenus *in vivo*, à savoir qu'il existe une fenêtre de restriction temporelle de l'activation de la glande pinéale chez le hamster syrien. Il semble donc possible d'utiliser ce protocole par la suite pour tester des stimulations à différents niveaux de la voie de signalisation à condition d'attendre au moins 5 heures de stimulation afin de s'affranchir de l'effet du prélèvement sur l'induction des différents facteurs.

### C. Reproduction de la restriction diurne de l'induction de *c-fos*, *Icer* et l'*Aa-nat* et de la phosphorylation de CREB *ex vivo*.

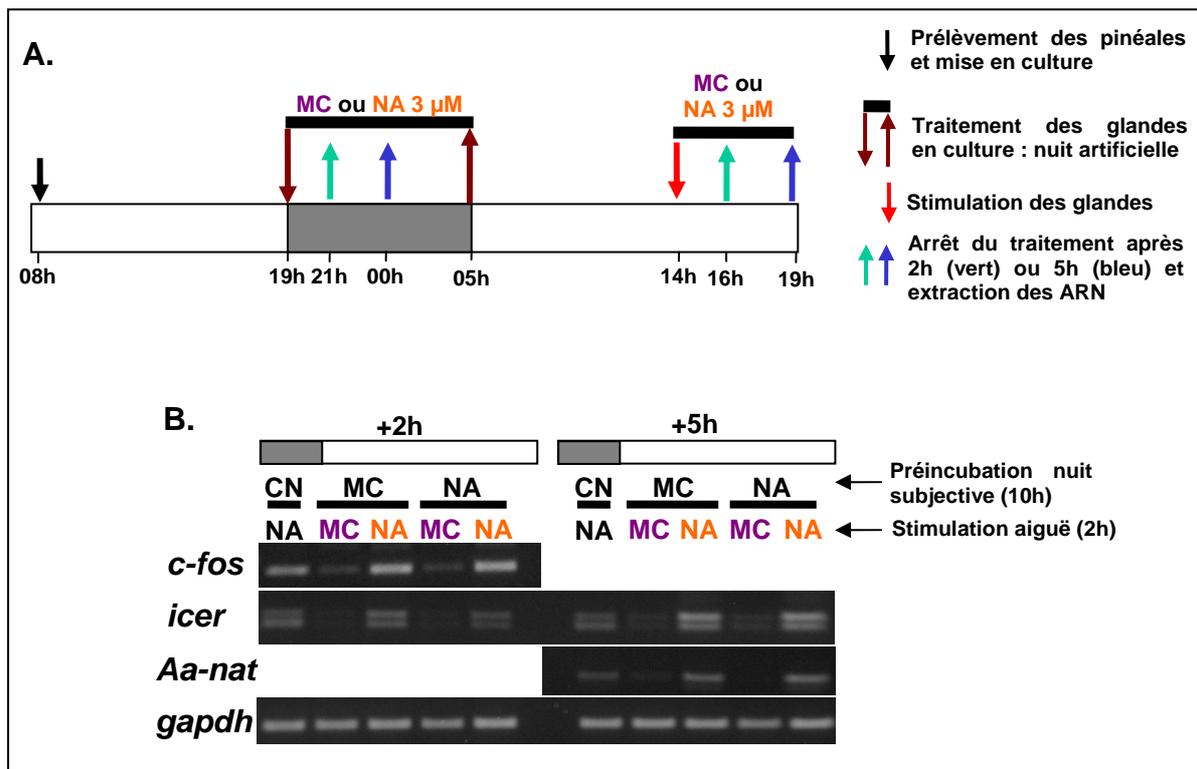
Le but de cette série d'expériences était tout d'abord de déterminer s'il était possible de reproduire artificiellement le phénomène de restriction temporelle dans des glandes pinéales *ex vivo*. Sachant que ce phénomène, *in vivo*, dépend du contrôle de la glande pinéale par l'horloge des NSC (voir **article 2**), nous avons voulu savoir si la NA était le signal par lequel l'horloge permet la mise en place de la restriction. Nous avons donc tenté de reproduire artificiellement cette restriction en soumettant les glandes pinéales à une ou deux "nuits artificielles" *ex vivo*, sous forme d'une ou deux incubations des glandes pinéales avec ou sans NA pendant 10 heures, puis en les stimulant durant la deuxième partie du jour d'après.

Les résultats obtenus en soumettant les glandes pinéales à une nuit artificielle avec de la NA, sont présentés **figure 35** (pour les protéines pCREB et c-FOS) et **figure 36** (pour les ARNm de *c-fos*, *Icer* et l'*Aa-nat*). Que ce soit pour les ARNm ou les protéines, le fait de laisser les glandes pendant 24h en culture (nuit artificielle sans NA; condition comparable à du LL), permet une induction de ces différents facteurs en deuxième partie de journée le jour suivant. Cette condition abolit donc la restriction diurne de l'induction noradrénergique de ces facteurs. Ceci suggère que la restriction temporelle observée *in vivo* n'est pas endogène à la glande pinéale, mais nécessite l'intervention d'un signal externe pour se mettre en place, venant sans doute de l'horloge. Cependant, une nuit artificielle mimée par l'incubation des glandes pinéales dans la NA pendant 10 heures permet également une stimulation des différents facteurs le jour suivant (identique à celle observée dans la condition précédente). Cet effet ne semble pas dû à une inefficacité de la stimulation nocturne, car nous avons observé une induction de ces facteurs 2-3 et 5 heures après le début de l'incubation avec la NA (contrôles de nuit, CN), ainsi qu'une élévation des niveaux de mélatonine (résultats non montrés).

Ceci suggère donc que la NA ne serait pas le signal recherché. Il est possible qu'il existe un signal inhibant la voie de signalisation de jour et qui n'est plus présent *ex vivo*. Cependant, il est également possible que nos résultats soient dus à un artefact causé par la libération constante de NA à partir des fibres sympathiques se dégradant, même si les glandes pinéales sont cultivées durant les périodes sans stimulation avec un MC dépourvu d'acide ascorbique afin de favoriser la dégradation de cette NA endogène.



**Figure 35 : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueur d'activation de la glande pinéale de hamster syrien *ex vivo*.** Les glande pinéale de hamsters syriens acclimatés en LD 14:10 ont été prélevées à 08h, puis mises en culture sous atmosphère 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> à 37°C et traitées selon la séquence temporelle décrite en (A). Brièvement, les glandes pinéales (3 par condition) ont été incubées dans du milieu de culture (MC) ou de la noradrénaline (NA, 3  $\mu$ M) à 19h (11 heures après le début de la culture) pour une durée de 10 heures, ceci afin de mimer (ou non) artificiellement la libération nocturne de NA auxquelles elles sont soumises *in vivo*. 3 heures après le début de l'incubation avec la NA, 3 glandes ont été prélevées afin de vérifier la bonne stimulation (contrôle de nuit, CN). Après les 10 heures, le milieu est changé et remplacé par du MC. A 14h, les glandes pinéales sont incubées dans un MC supplémenté en NA ou non pour une durée de 2 heures. A la fin de la stimulation, les 3 glandes par conditions sont prélevées et les protéines sont extraites selon la première méthode décrite dans la section Matériels et Méthodes. L'expression de pCREB, c-FOS et de la tubuline a été déterminée par Western blot (B). Lors des stimulations, le MC et la NA ont été supplémentés en acide ascorbique (100 mg/L) afin d'éviter l'oxydation de la NA.



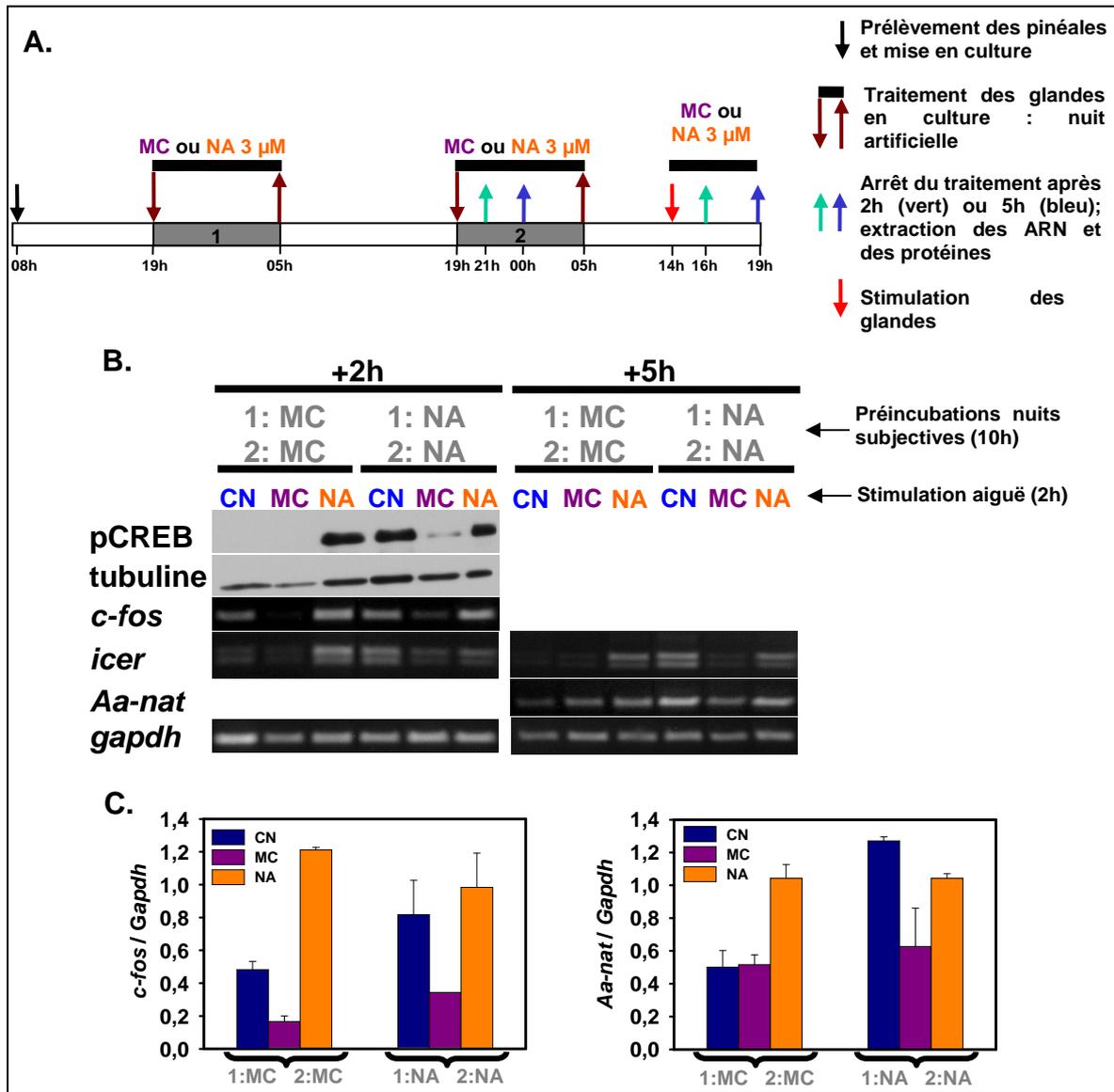
**Figure 36 : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueur d'activation de la glande pinéale de hamster syrien *ex vivo*.** Les glandes pinéales de hamsters syriens acclimatés en LD 14:10 ont été prélevées à 08h, puis mises en culture sous atmosphère 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> à 37°C et traitées selon la séquence temporelle décrite en (A). Brièvement, les glandes (2 par conditions) ont été incubées dans du milieu de culture (MC) ou de la noradrénaline (NA, 3 µM) à 19h (11 heures après le début de la culture) pour une durée de 10 heures, ceci afin de mimer (ou non) artificiellement la libération nocturne de NA auxquelles elles sont soumises *in vivo*. 3 heures après le début de l'incubation avec la NA, 3 glandes ont été prélevées afin de vérifier la bonne stimulation (contrôle de nuit, CN). Après les 10 heures, le milieu est changé et remplacé. A 14h, les glandes sont incubées dans un MC supplémenté en NA ou non pour une durée de 2 ou 5 heures. A la fin de la stimulation, chaque pinéale est prélevée et congelée, puis les ARNm sont extraits selon le protocole détaillé dans la section Matériels et Méthodes. L'expression *c-fos*, *Icer*, *Aa-nat* et la *Gapdh* est déterminée par RT-PCR (B). Lors des stimulations, le MC et la NA ont été supplémentés en acide ascorbique (100 mg/L).

### III. Modèle *ex vivo* de la restriction diurne

Afin de s'affranchir de cette possibilité, nous avons renouvelé cette expérience en soumettant les glandes pinéales à deux nuits artificielles consécutives (**figure 37**). Dans cette dernière expérience, les protéines et les ARNm ont été extraits dans les mêmes glandes pinéales. Les résultats obtenus sont identiques à ceux de l'expérience précédente. Que les glandes pinéales aient été soumises aux deux nuits artificielles avec la NA ou non, une stimulation aiguë avec de la NA de jour induit pCREB, *c-fos*, *Icer* et l'*Aa-nat*, à des niveaux équivalents aux contrôles de nuit.

Ces expériences suggèrent donc encore une fois que la restriction ne semble pas mise en place suite à la stimulation noradrénergique nocturne des glandes pinéales. Le fonctionnement interne de ces glandes soumises aux deux nuits artificielles est peut-être perturbé par les 24 premières heures en présence de NA. Il serait donc ici intéressant de tenter de réinduire ce mécanisme de restriction suite à 24 ou 48 heures de culture des pinéales sans aucun traitement afin de laisser les fibres noradrénergiques se dégrader totalement. Cependant, il est fort probable également que le protocole utilisé ne mime pas parfaitement la nuit endogène *in vivo*, du fait de l'absence de nombreux autres signaux régulateurs non présents *ex vivo*.

Il est important de mentionner ici que ces études ne constituent que des résultats préliminaires et qu'il faudrait d'une part confirmer les résultats obtenus et d'autre part continuer la caractérisation de cette fenêtre de restriction temporelle. La mise au point de ce modèle *ex vivo* est nécessaire pour étudier le rôle des différents acteurs assurant la mise en place de ce mécanisme. Il sera également très utile pour étudier des mécanismes d'induction de l'*Aa-nat* durant la nuit, par exemple pour assurer la spécificité de l'effet de la cycloheximide sur la glande pinéale.



**Figure 37 : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueur d'activation de glandes pinéales de hamster syrien *ex vivo*.** Les glandes pinéales de hamsters syriens acclimatés en LD 14:10 ont été prélevées à 08h, puis mises en culture sous atmosphère 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> à 37°C et traitées selon la séquence temporelle décrite en (A). Brièvement, elles (2 par conditions) ont été incubées dans du milieu de culture (MC) ou de la noradrénaline (NA, 3 μM) de 19h à 05h, le premier et le deuxième jour de l'expérience, afin de mimer (ou non) artificiellement la libération nocturne de NA auxquelles elles sont soumises *in vivo*. 2 et 5 heures après le début de l'incubation avec la NA du deuxième jour, 2 glandes ont été prélevées afin de vérifier la bonne stimulation (contrôle de nuit, CN). Après les 10 heures, le milieu est changé et remplacé. A 14h le troisième jour, elles sont incubées dans un MC supplémenté en NA ou non pour une durée de 2 ou 5 heures. A la fin de la stimulation, chaque pinéale est prélevée et congelée, puis les ARNm et les protéines sont extraits selon le protocole détaillé dans la section Matériels et Méthodes. L'expression de pCREB, la tubuline, *c-fos*, *Icer*, *Aa-nat* et la *Gapdh* est déterminée par Western blot et RT-PCR (B). En (C) est présenté un exemple de quantification des signaux obtenus pour *c-fos* et l'*Aa-nat*, rapportés à la *Gapdh*.

*Discussion générale /*

*Perspectives*



Chez la plupart des mammifères, la mélatonine joue un rôle important dans la transmission de l'information temporelle à l'organisme, d'un point de vue journalier par sa synthèse et sa libération uniquement durant la phase nocturne du nycthémère, mais surtout d'un point de vue saisonnier par la variation de la durée de cette synthèse en fonction des changements annuels dans la durée de la nuit. Ce message endocrine est essentiel à la synchronisation des fonctions physiologiques avec les saisons, plus particulièrement la reproduction (Bittman & Karsch, 1984; Goldman, 2001; Pévet, 1988; Reiter, 1993b). Ce rôle implique une régulation temporelle précise de sa synthèse chez les espèces saisonnières dont la pérennité dépend de la naissance et du sevrage des petits à une période de l'année où les conditions environnementales sont les meilleures.

Chez tous les mammifères, l'horloge biologique des NSC contrôle le rythme de synthèse de mélatonine, *via* l'activation/inactivation nocturne de l'enzyme AA-NAT (Klein *et al.*, 1997; Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revues). L'étude de la régulation temporelle de cette enzyme a apporté de nombreuses informations quant aux mécanismes générant le rythme journalier et saisonnier de la synthèse de mélatonine. Chez les rongeurs, l'induction de la synthèse de mélatonine n'est possible que suite à une néosynthèse de l'ARNm de l'*Aa-nat*, elle-même régulée par un jeu d'activation/répression de sa transcription par diverses protéines (voir **section III de l'introduction**). Malgré cet aspect commun, la régulation de l'AA-NAT chez le hamster syrien, un rongeur à physiologie saisonnière, apparaît différente de celle observée chez le rat ou la souris. En effet, la restriction temporelle de la transcription du gène codant cette enzyme apparaît beaucoup plus stricte, car contrairement à ce qui est observé chez le rat, elle n'est possible que durant la deuxième moitié de la nuit. Par ailleurs des différences dans l'induction photopériodique de l'*Aa-nat* existent également entre les deux espèces.

L'ensemble des études réalisées pendant ma thèse vise à comprendre les mécanismes responsables des différences observées entre le rat et le hamster syrien. Je me suis plus particulièrement intéressé à la balance existant entre divers facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs et contrôlant la restriction temporelle de la transcription de l'*Aa-nat* chez cette espèce.

## **I. Contrôle nocturne de la transcription de l'Aa-nat chez le rat et le hamster syrien : une balance entre facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs**

L'activation nocturne de l'AA-NAT est principalement régulée par la libération de NA sur la glande pinéale. Cependant, de nombreuses différences existent dans cette régulation selon l'espèce considérée. Deux modes de régulation de l'AA-NAT, transcriptionnelle et post-traductionnelle, ont été mis en évidence et coexistent avec une importance plus ou moins grande chez toutes les espèces (Klein *et al.*, 1997).

Chez le rat, le délai d'initiation de la synthèse nocturne de mélatonine est d'environ 4 à 5 heures. Chez cette espèce, l'ARNm de l'Aa-nat est exprimé très faiblement durant le jour et les niveaux augmentent fortement de nuit suite à la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Roseboom *et al.*, 1996). L'arrêt de la synthèse de mélatonine est conduit par une interruption de la libération de la NA, induisant une dégradation de la protéine AA-NAT. Cette diminution a lieu avant la fin de la nuit, quelle que soit la photopériode considérée, et apparaît indépendante de la diminution de la transcription de l'Aa-nat (Illnerová & Vanecek, 1980; Ribelayga *et al.*, 1999a). Cette dernière débute également avant la fin de la nuit, et serait principalement conduite par la diminution de libération de la NA par l'horloge.

La régulation de la synthèse de mélatonine chez le rat a longtemps été considérée comme un modèle commun à tous les rongeurs. En effet, tous les autres rongeurs étudiés présentent une régulation transcriptionnelle de l'AA-NAT (Ribelayga *et al.*, 2000; Garidou *et al.*, 2002a; Garidou *et al.*, 2003a; Garidou *et al.*, 2003b; Garidou *et al.*, 2003c), mais des différences apparaissent si l'on considère la régulation même de la transcription nocturne de l'Aa-nat. Chez le hamster syrien, le délai d'induction de la synthèse de mélatonine est allongé à 6-8 heures après le début de la nuit (Miguez *et al.*, 1995). Ceci est dû à un délai supplémentaire dans l'induction de la transcription de l'Aa-nat (Gauer *et al.*, 1999; Garidou *et al.*, 2003b). De plus, la terminaison de la transcription de l'Aa-nat et de la synthèse de mélatonine chez cette espèce diffère en fonction de la photopériode considérée : elle est initiée par l'arrivée de la lumière en photopériode longue et contrôlée par l'horloge en photopériode courte.

Connaissant l'importance de la balance d'expression de divers facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs dans la restriction temporelle de l'expression de l'Aa-nat chez le rat (voir **section III de l'introduction**), nous avons étudié les différences pouvant exister dans

l'expression de ces facteurs chez le hamster syrien. Ceci permettra d'expliquer en quoi la régulation nocturne de la synthèse de mélatonine est identique et/ou différente chez cette espèce. Nous avons orienté nos recherches sur les facteurs de transcription identifiés comme régulateurs réels ou potentiels de la synthèse de mélatonine chez le rat, à savoir CREB, ICER et les protéines du complexe AP-1.

### A. Réponse à l'AMPc : antagonisme pCREB / ICER

L'augmentation intracellulaire d'AMPc, induite par la stimulation  $\beta$ -adrénergique, est le signal le plus important dans l'initiation la synthèse de mélatonine chez le rat. La stimulation  $\alpha$ -adrénergique permet uniquement une potentialisation en amplifiant la production d'AMPc et en agissant également directement sur la protéine AA-NAT (voir **section II.C de l'introduction**). En ce qui concerne l'ARNm de l'*Aa-nat*, seule la voie  $\beta$ -adrénergique est stimulatrice, la voie  $\alpha$ -adrénergique n'ayant qu'un effet potentialisateur minimal (Roseboom *et al.*, 1996). La transcription de l'*Aa-nat* et la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien dépendent des mêmes mécanismes que chez le rat, avec cependant une dépendance plus forte à la stimulation  $\alpha$ -adrénergique (Garidou *et al.*, 2003b).

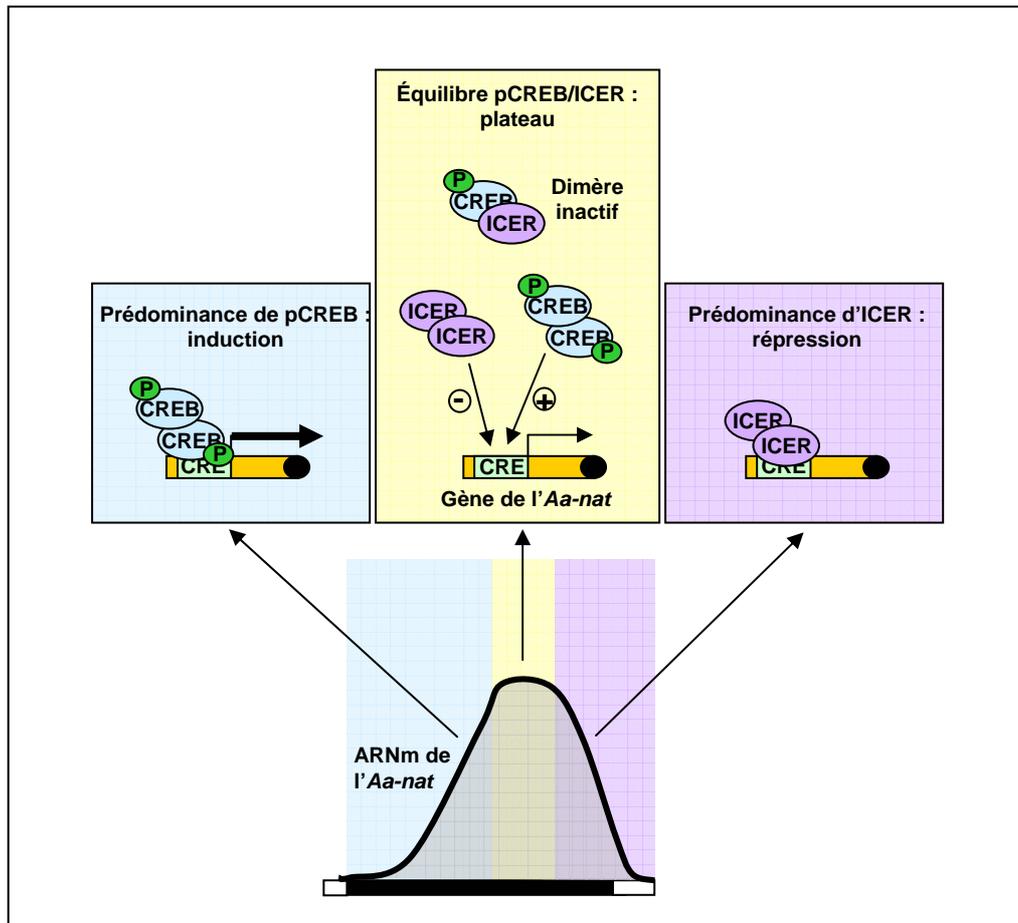
L'induction de la transcription des gènes par l'AMPc se fait *via* l'activation de facteurs de transcription constitutifs appartenent à la famille CREB/CREM/ATF, qui se fixent sur les sites CRE des promoteurs et recrutent le complexe de préinitiation (Montminy, 1997). Dans la glande pinéale de rat, CREB est un élément majeur dans la régulation du profil rythmique d'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* (voir **section III.C de l'introduction**).

D'après nos résultats, CREB est exprimé de manière constitutive dans la glande pinéale du hamster syrien (**article 1**). Son profil d'activation est similaire à celui observé chez le rat (Maronde *et al.*, 1999a) : l'expression de pCREB augmente entre une et deux heures après le début de la nuit, est suivie d'une phase de plateau, puis diminue légèrement en fin de nuit, mais de manière moins prononcée que chez le rat. La phosphorylation de CREB est dépendante de la stimulation noradrénergique, puisqu'elle est inhibée par des antagonistes adrénergiques et est induite par des agonistes chez des animaux exposés à la lumière en début de nuit (voir **section I.C des résultats**). Cependant, contrairement au rat, l'expression de pCREB est fortement diminuée par des antagonistes  $\alpha$ -adrénergiques, expliquant certainement le fort effet inhibiteur de ces mêmes antagonistes sur la transcription de l'*Aa-nat* (Garidou *et al.*, 2003b). Nos résultats ne nous permettent cependant pas de conclure quant au rôle de la

voie  $\alpha$ -adrénergique dans la phosphorylation de CREB, à savoir une activation directe ou une potentialisation de la stimulation  $\beta$ -adrénergique. Pour cela, il serait intéressant de réitérer l'expérience sur des animaux exposés à la lumière en début de nuit et de tester l'effet de la phényléphrine seule. Ceci pourrait également se faire sur des glandes pinéales en culture, ce qui permettrait également de tester l'influence de l'augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (par des ionophores) sur la phosphorylation de CREB.

La réponse des gènes à l'AMPC est également caractérisée par une phase de restriction de l'induction suivant une exposition prolongée à un stimulus. Celle-ci pourrait être due à la présence d'ICER, un facteur inhibiteur empêchant pCREB d'accéder aux sites CRE des promoteurs. Dans la glande pinéale de rat et de souris, ICER est fortement présent en fin de nuit et participerait à la diminution de l'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* (Foulkes *et al.*, 1996a; Maronde *et al.*, 1999a; Stehle *et al.*, 1993; von Gall *et al.*, 2000a). Cependant, la sous-expression d'ICER chez la souris ou le rat ne change pas le profil général de diminution de l'expression de l'*Aa-nat* en fin de nuit ou de stimulation (Foulkes *et al.*, 1996a; Maronde *et al.*, 1999a). Celle-ci serait essentiellement due à une diminution des concentrations d'AMPC suite à l'arrêt de la libération de NA et à une déphosphorylation de pCREB par des phosphatases. Néanmoins, ICER pourrait limiter le taux d'induction maximal de la transcription de l'*Aa-nat* en deuxième moitié de nuit. En effet, à cette période, le ratio pCREB/ICER diminue et devient progressivement en faveur d'ICER, qui exercerait son action inhibitrice et créerait ainsi le plateau observé dans le profil d'expression de l'*Aa-nat* (**figure 38**).

Nos résultats chez le hamster sont en faveur d'une telle hypothèse. L'ARNm d'*Icer* est fortement exprimé dans la glande pinéale du hamster syrien selon un rythme journalier dépendant de la stimulation  $\beta$ -adrénergique, et avec un maximum 5 heures après le début de la nuit, c'est-à-dire avant le pic de l'*Aa-nat* (Diaz *et al.*, 2003). La protéine ICER est également fortement exprimée, mais le rythme observé montre des variations d'amplitude moins amples (environ 4 fois) que pour l'ARNm, avec un maximum en fin de nuit/début de jour (**article 2**). Bien que l'arrêt total de la transcription de l'*Aa-nat* soit initié par la fin de la nuit en photopériode longue, le taux d'induction diminue (phase de plateau) avant la fin de la nuit, en parallèle de l'augmentation d'ICER. L'analyse est plus évidente en photopériode courte, où l'expression de l'*Aa-nat* diminue avant la fin de la nuit selon un profil similaire à celui observé chez le rat. Dans cette condition, nous trouvons la même augmentation d'ICER en fin de nuit qu'en photopériode longue, celle-ci étant maximale au moment où le plateau d'expression de l'*Aa-nat* s'installe, et avant la diminution de l'expression de pCREB (**figure 38**).



**Figure 38 : Modèle de régulation de l'expression nocturne de l'ARNm de l'Aa-nat par la balance d'expression de pCREB et d'ICER dans la glande pinéale du rat et du hamster syrien.** En début de nuit, la libération de NA induit la phosphorylation de CREB qui se fixe sur les sites CRE du promoteur de l'Aa-nat et active sa transcription (zone bleue). En milieu de nuit, l'expression d'ICER augmente, ce qui équilibre la balance activation/répression et crée ainsi le plateau observé (zone jaune). La répression s'effectue alors soit par l'occupation des sites CRE par des dimères ICER, soit par la formation de dimère CREB/ICER ne pouvant plus activer la transcription. En fin de nuit (zone violette), l'expression de pCREB diminue et les dimères ICER/ICER deviennent majoritaires. Ils occupent alors massivement les sites CRE et participent à la diminution de l'expression de l'Aa-nat, en parallèle de l'arrêt de la libération de NA.

Cependant, en fin de nuit, la diminution de l'expression en elle-même serait plutôt due à une diminution de la phosphorylation de pCREB, sans doute suite aux mêmes mécanismes que chez le rat. *Ce dernier point reste cependant à vérifier chez le hamster en étudiant le profil de libération de la NA in vivo, par exemple par microdialyse, ainsi que l'expression et l'activité des phosphatases en fin de nuit. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la sous-expression d'ICER (et/ou de la sur-expression) sur la diminution de la transcription de l'Aa-*

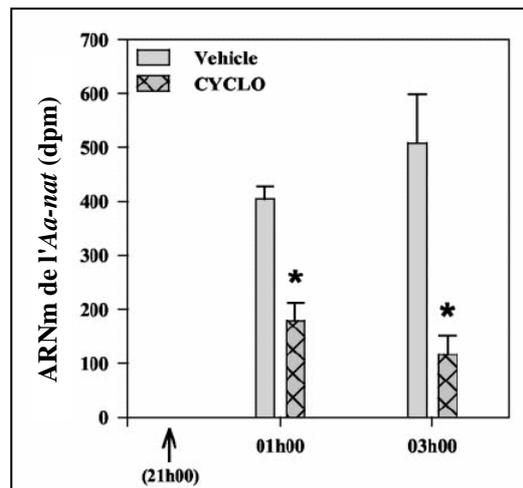
*nat en fin de nuit, par exemple à l'aide de vecteurs adénoviraux codant des ARN interférants (déjà construits suite à un séjour dans le laboratoire du Dr Anthony HO à Edmonton).*

En conclusion, les profils similaires d'expression de pCREB et d'ICER dans la glande pinéale du hamster syrien et du rat suggèrent que la balance temporelle d'expression de ces deux facteurs jouerait le même rôle dans la régulation de la transcription de l'Aa-nat chez ces deux espèces (**figure 38**). *Des études plus poussées, notamment sur le profil temporel de fixation de ces deux protéines sur le promoteur de l'Aa-nat, permettraient de répondre à cette question. Ceci nécessiterait tout d'abord le séquençage et le clonage du promoteur de l'Aa-nat chez le hamster, puis l'étude de l'occupation temporelle (in vivo et in vitro) des sites CRE par ces deux facteurs par EMSA ou immunoprécipitation de la chromatine.*

L'induction rapide de pCREB en début de nuit suggère une libération de la NA entre une et deux heures après le début de la nuit, comme chez le rat. Cette libération précoce de NA ne permet donc pas d'expliquer le délai important observé dans l'initiation de la transcription de l'Aa-nat en début de nuit chez le hamster. Une étude précédente a révélé que l'injection de cycloheximide en début de nuit inhibe fortement, mais pas totalement (50 à 70%), l'expression nocturne de l'Aa-nat chez le hamster syrien (**figure 39**, Garidou *et al.*, 2003b). Ce résultat suggère que l'induction de l'Aa-nat chez le hamster est dépendante de la néosynthèse de protéines en début de nuit, ce qui en fait un modèle particulier car ce mécanisme n'existe pas chez le rat. Cependant, la diminution n'étant pas totale, cela n'exclut pas un rôle pour pCREB.

### **B. Les protéines AP-1 comme activateur ou répresseur ?**

Suite à cette observation, nous avons tenté de caractériser les protéines activatrices nécessaires à l'initiation de la transcription de l'Aa-nat chez le hamster syrien. Nous avons étudié les protéines du complexe AP-1 pour plusieurs raisons : 1) ce sont des facteurs de transcription nécessitant une néosynthèse avant d'exercer leur action, 2) leur rôle stimulateur a été décrit dans de nombreux systèmes cellulaires, et 3) le promoteur de l'Aa-nat chez plusieurs espèces contient au moins un site AP-1 à proximité du site d'initiation. Dans le but de caractériser le rôle de ces protéines dans la régulation de l'expression temporelle de l'Aa-nat chez le hamster, nous avons étudié leur profil d'expression journalier. Nous avons également caractérisé ce profil dans la glande pinéale de rat à titre de comparaison.



**Figure 39 : La transcription nocturne de l'Aa-nat dans la glande pinéale du hamster syrien nécessite la synthèse de protéines activatrices en début de nuit.** Les animaux ont été injectés avec de la cycloheximide (CYCLO) deux heures après le début de la nuit (21h00) et les niveaux d'ARNm de l'Aa-nat dans la glande pinéale ont été mesurés par hybridation *in situ* en fin de nuit (01h00 et 03h00), lorsque l'expression est maximale. L'injection de cycloheximide inhibe l'expression de l'Aa-nat en fin de nuit, ce qui laisse supposer que la synthèse de facteurs de transcription activateurs en début de nuit est nécessaire à l'induction de l'Aa-nat. (d'après Garidou *et al.*, 2003)

### 1. AP-1 et Aa-nat dans la glande pinéale de rat

L'expression et la régulation noradrénergique de ces protéines ont été bien caractérisées dans la glande pinéale de rat (voir **section III.D de l'introduction générale** ; Carter, 1997), mais leur rôle reste encore très vague. Sur la base de leur profil de fixation sur les séquences TRE par EMSA, un rôle inhibiteur leur a été attribué dans la régulation de la transcription de l'Aa-nat. En effet, l'activité des protéines du complexe AP-1 est maximale en deuxième partie de nuit chez le rat, quand l'expression de l'ARNm de l'Aa-nat atteint sa phase de plateau et diminue (Baler & Klein, 1995; Carter, 1994; Guillaumond *et al.*, 2000).

Nos résultats montrent tout d'abord un profil d'expression rythmique des protéines c-FOS, JUN-B et c-JUN dans la glande pinéale de rat (**article 1**), avec un maximum en deuxième moitié de nuit, en parallèle de l'expression de l'Aa-nat. Cependant, le profil obtenu pour c-FOS est différent de celui décrit dans la littérature (Baler & Klein, 1995). La protéine décrite dans cette étude montrait un poids moléculaire de 62 kD et était exprimée constitutivement, correspondant certainement à une forme phosphorylée de c-FOS. Bien qu'ayant utilisé la même référence d'anticorps, notre étude montre l'expression d'une forme de 55 kD exprimée

uniquement en fin de nuit, bien que très faiblement, car nous avons dû utiliser un système de révélation plus sensible. Il est intéressant de noter que la détection de cette protéine avait été possible *in vitro* suite à de fortes doses de NA (Baler & Klein, 1995). Ces deux protéines peuvent donc correspondre à des formes différemment phosphorylées de c-FOS, dont la régulation serait intéressante à étudier. Néanmoins, la faible expression de c-FOS que nous mettons en évidence nous fait considérer cette protéine comme un acteur mineur du complexe AP-1 dans la glande pinéale de rat. Ce résultat corrobore une étude antérieure montrant que l'activité de fixation de c-FOS sur les séquences TRE dans la glande pinéale de rat est maximale en fin de nuit, mais que celle-ci est minimale comparée aux autres protéines AP-1 (Guillaumond *et al.*, 2000). Ceci appuie notre conclusion selon laquelle c-FOS ne semble pas important dans la régulation de la transcription de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale de rat.

Il a été proposé que les protéines Fra-2 et JUN-D soient les principaux acteurs impliqués dans l'inhibition de la transcription de l'*Aa-nat* en fin de nuit. Cependant, l'hétérodimérisation de ces deux protéines donne généralement un complexe avec une forte activité transcriptionnelle (Suzuki *et al.*, 1991). De plus, la mutation ou la sous-expression de Fra-2 n'altère pas l'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* (Ho *et al.*, 2007b; Smith *et al.*, 2001).

Le rôle de la protéine JUN-B semble plus intéressant car cette dernière a été décrite comme généralement inhibitrice de la transcription (Mechta-Grigoriou *et al.*, 2001). Nos résultats montrent une forte augmentation de son expression en fin de nuit. De plus, l'inhibition de sa synthèse par la cycloheximide durant la nuit, en plus de c-JUN, induit une augmentation de l'expression de l'*Aa-nat* en fin de nuit (**article 1**), ce qui appuie un rôle répresseur de cette protéine à cette même période. Cependant, vu le manque de spécificité de la cycloheximide, cet effet pourrait également venir de l'inhibition de l'expression d'ICER. L'action répressive de JUN-B se fait généralement par la séquestration de facteurs déjà actifs. En effet, JUN-B a une faible affinité pour l'ADN, et en se dimérisant par exemple avec c-JUN ou JUN-D, elle diminue le potentiel *trans*-activateur de ces deux protéines essentiellement en diminuant leur affinité pour l'ADN (Deng & Karin, 1993; Metz *et al.*, 1994; Ryseck & Bravo, 1991). Ceci explique certainement pourquoi JUN-B n'a pas été défini comme un composant majeur du complexe AP-1 dans la glande pinéale de rat (Guillaumond *et al.*, 2000). En effet, la plupart des études ont été réalisées par la technique d'EMSA, qui mesure une liaison à une séquence d'ADN. Puisque JUN-B possède une faible affinité pour l'ADN, ces études n'ont pas révélé une forte liaison de cette protéine sur les séquences TRE utilisées. Le profil d'expression de JUN-B, montrant une forte expression en fin de nuit, est en accord avec un

rôle inhibiteur de l'expression de l'Aa-nat en fin de nuit. Cependant, cela nécessiterait que la transcription de l'Aa-nat dépende du site TRE, ce qui n'a pas encore été démontré. L'induction de l'Aa-nat par les sites TRE pourrait être conduite par des dimères formés par les protéines c-JUN et JUN-D, qui sont généralement actifs dans l'induction de la transcription, bien qu'ils soient moins efficaces que les dimères formés avec les protéines de la famille FOS (Herdegen & Leah, 1998). L'action inhibitrice de JUN-B pourrait alors se faire par la séquestration de c-JUN ou JUN-D en fin de nuit (**figure 40**). *Afin de vérifier ces hypothèses, il faudrait tout d'abord vérifier que le site AP-1 est bien nécessaire soit à l'activation soit à l'inhibition de l'Aa-nat. Pour cela, il serait intéressant de réaliser une mutation du site AP-1 du promoteur de l'Aa-nat chez le rat, et de voir si le profil d'induction/arrêt de la transcription de l'Aa-nat varie en fonction de cette mutation.*

La dernière protéine que nous avons étudiée est c-JUN. Son profil est très particulier car il montre une forte expression basale, avec une faible augmentation en fin de nuit. Cette forte expression basale n'est pas surprenante car elle a déjà été mentionnée dans d'autres structures cérébrales (Herdegen & Leah, 1998). Le profil de fixation de c-JUN sur les séquences TRE dans la glande pinéale de rat montre une augmentation en fin de nuit (Guillaumond *et al.*, 2000), lorsque la transcription de l'Aa-nat diminue. D'après ces observations, nous avons tout d'abord supposé que c-JUN, en dimérisant avec JUN-B en fin de nuit, inhibait la transcription de l'Aa-nat en fin de nuit. Cependant, c-JUN est décrite comme un composant fortement activateur de la transcription. Sa forte expression en début de nuit pourrait lui conférer un rôle activateur, mais probablement pas par la fixation sur le site TRE de l'Aa-nat, car celle-ci n'augmente qu'en fin de nuit. En homodimères ou en association avec FOS, c-JUN a une forte affinité non seulement pour les séquences TRE, mais également pour les séquences CRE et peut initier la transcription à partir de celles-ci (Ryseck & Bravo, 1991; Sassone-Corsi *et al.*, 1990). Elle peut également se dimériser avec ATF-2 afin d'induire la transcription par les sites CRE (Cesare *et al.*, 1995; Ivashkiv *et al.*, 1990). Cette observation est très intéressante car elle nous permet de supposer que c-JUN pourrait avoir un rôle activateur dans la transcription de l'Aa-nat en début de nuit, par l'activation des sites CRE. Par ailleurs, la mutation des sites CRE inhibe fortement la transcription de l'Aa-nat, mais aucune donnée de la littérature ne permet d'affirmer que la transcription conduite par les sites CRE n'est dépendante que de la fixation de pCREB sur ces séquences dans la glande pinéale. *L'utilisation de dominants négatifs de la protéine CREB pourrait permettre de répondre aisément à cette question.*

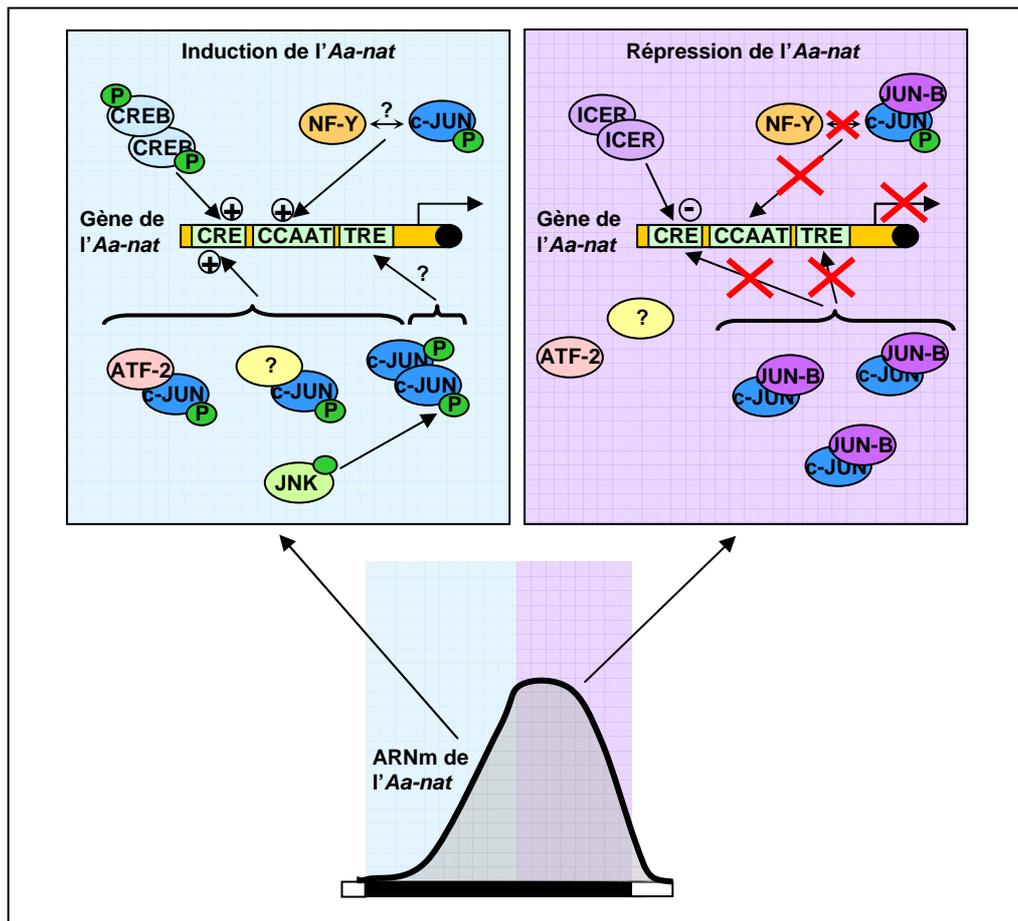
L'activité de c-JUN est principalement régulée par sa phosphorylation par différentes kinases, dont JNK (**figure 40**, Hess *et al.*, 2004; Karin, 1995). Récemment, une étude a démontré que l'inhibition de cette MAPK diminuait très fortement l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* par l'AMPc (Chansard *et al.*, 2005), ce qui souligne le rôle potentiellement activateur de c-JUN dans l'induction de l'*Aa-nat*. La phosphorylation de c-JUN en début de nuit, induite par l'AMPc, associée à sa forte expression basale en début de nuit pourrait également expliquer, pourquoi l'injection de cycloheximide en début de nuit n'influence pas l'expression de l'*Aa-nat* (Roseboom *et al.*, 1996). Malgré ce rôle potentiellement activateur de c-JUN, il est intéressant de mentionner ici qu'elle a également été impliquée dans l'inhibition de la transcription conduite par les sites CRE en empêchant CREB d'accéder à ces mêmes sites (Ghosh *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Ceci pourrait également lui conférer une action répressive de la transcription de l'*Aa-nat* en fin de nuit.

c-JUN pourrait également induire la transcription de l'*Aa-nat* par un autre mécanisme. Une étude a démontré que c-JUN participe au recrutement du facteur de transcription NF-Y sur les sites CCAAT, afin d'augmenter la transcription conduite par ces sites (Su *et al.*, 2005). La mutation de la boîte CCAAT du promoteur de l'*Aa-nat* réduit fortement sa transcription induite par l'AMPc. Nous avons vu que NF-Y est un facteur important de la régulation de ce site pour le promoteur de la TpOH, et lui confère la capacité d'être induite par l'AMPc indépendamment de la présence des sites CRE (voir **section III.F de l'introduction**). Ainsi, c-JUN pourrait avoir un rôle activateur dans l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* en début de nuit en recrutant NF-Y sur les sites CCAAT.

*Afin de clarifier le rôle de c-JUN dans la glande pinéale de rat, plusieurs expériences sont envisageables. Tout d'abord, il serait intéressant d'étudier le profil de fixation de c-JUN (mais également des autres protéines AP-1) sur les sites CRE du promoteur de l'Aa-nat par EMSA. Ensuite la mutation ou la sous-expression de cette protéine pourrait nous permettre de définir précisément son action inhibitrice ou activatrice. Enfin, dans les deux cas, l'étude de son profil de phosphorylation et de ses partenaires potentiels apparaissent également nécessaires dans la compréhension de son mode d'action. Les mêmes expériences sont envisageables pour les autres protéines AP-1 (surtout JUN-B), mais également pour les partenaires potentiels cités précédemment (ATF-2, NF-Y).*

En conclusion, nous proposons que c-JUN pourrait être un acteur majeur de la régulation transcriptionnelle de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale de rat. Considérant le fait que cette protéine puisse être responsable d'une triple régulation *via* les sites TRE, CRE et CCAAT du

promoteur de l'*Aa-nat* (**figure 40**), son rôle devrait être étudié avec plus d'attention. Il est également probable que d'autres protéines AP-1 aient un rôle à jouer, notamment JUN-B dans l'inhibition de l'action de c-JUN en fin de nuit (**figure 40**).



**Figure 40 : Modèle de régulation de l'expression nocturne de l'ARNm de l'*Aa-nat* par la balance d'expression des protéines AP-1 dans la glande pinéale de rat.** En début de nuit (zone bleue), la NA active JNK qui phosphoryle c-JUN. La transcription de l'*Aa-nat* peut alors être induite par la formation de dimères c-JUN/c-JUN se fixant sur les sites TRE et CRE, de dimères c-JUN/ATF-2 se fixant sur les sites CRE ou par l'interaction de c-JUN avec d'autres facteurs (?). Par ailleurs, son action activatrice pourrait se faire par le recrutement de NF-Y sur les sites CCAAT, par un mécanisme encore non expliqué (?). En fin de nuit (zone violette), l'augmentation de l'expression de JUN-B déséquilibre la formation de ces dimères activateurs. c-JUN dimérise alors massivement avec JUN-B (désactivation des autres facteurs ?), diminuant son affinité pour l'ADN, ce qui se traduit en un arrêt de l'induction de la transcription (croix rouges), donc une répression. Ce mécanisme se ferait en parallèle de l'augmentation d'expression d'ICER.

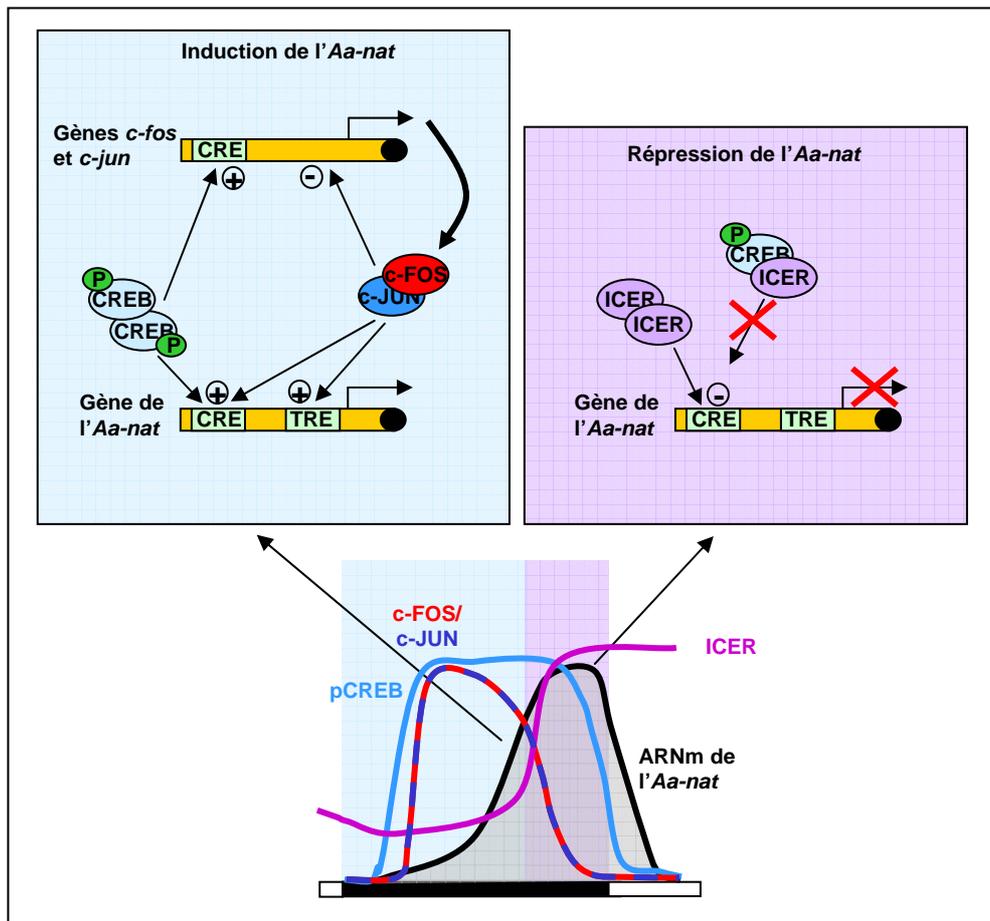
## **2. AP-1 et Aa-nat dans la glande pinéale de hamster syrien**

Le profil d'expression de c-FOS, c-JUN et JUN-B obtenu dans la glande pinéale du hamster syrien est différent de celui que nous avons observé chez le rat. En effet, ces 3 protéines sont induites dès le début de la nuit (entre 2 et 3 heures après l'extinction de la lumière), avant l'augmentation d'expression de l'ARNm de l'Aa-nat. Leur expression diminue graduellement jusqu'à devenir minimale en fin de nuit/début de jour. Une autre étude avait déjà mentionné l'expression de c-FOS dans la glande pinéale du hamster syrien, avec cependant un maximum d'expression en milieu de nuit et une forte diminution en fin de nuit (Koistinaho & Yang, 1990). La différence observée pourrait venir de l'anticorps utilisé dans cette étude, qui est apparemment plus spécifique de Fra-2 que de c-FOS (Baler & Klein, 1995).

La dimérisation de c-FOS avec c-JUN ou JUN-B donne généralement lieu à une activation de la transcription des gènes (Herdegen & Leah, 1998). Cependant, les dimères c-JUN/c-FOS sont beaucoup plus stables et ont une affinité plus forte pour les sites TRE des promoteurs (Ryseck & Bravo, 1991). De plus, nous montrons que JUN-B est très faiblement exprimée dans la glande pinéale du hamster syrien (utilisation d'un système de révélation beaucoup plus sensible en western-blot et non visible en immunohistochimie), tandis que c-FOS et c-JUN sont plus fortement exprimés. D'après ces observations, nous proposons que les protéines c-FOS et c-JUN forment la majeure partie du complexe AP-1 dans la glande pinéale de hamster syrien en début de nuit (**figure 41**). La faible expression de JUN-B ne serait pas suffisante pour entrer en compétition avec c-JUN pour la dimérisation avec c-FOS.

L'expression rapide et synchrone de c-FOS et c-JUN, avant l'induction de l'ARNm de l'Aa-nat, associée au fait que ces dimères sont activateurs, suggère que ces deux protéines sont importantes dans l'induction nocturne de la transcription de l'Aa-nat. La néosynthèse de ces protéines pourrait alors expliquer l'effet inhibiteur de la cycloheximide sur l'expression de l'Aa-nat dans la glande pinéale chez le hamster syrien (Garidou *et al.*, 2003b). En effet, nous montrons que l'injection de cycloheximide, avant le pic d'expression de c-FOS et de c-JUN à des hamsters syrien, réprime la synthèse de ces protéines et inhibe fortement l'expression de l'ARNm de l'Aa-nat en fin de nuit (**article 1**). Par contre, l'injection de cycloheximide après le pic d'expression de c-FOS/c-JUN a un effet nettement plus faible sur l'expression de l'Aa-nat. Ces résultats confortent donc notre hypothèse selon laquelle les facteurs de transcription c-FOS et c-JUN seraient impliqués dans l'induction nocturne de l'Aa-nat dans la glande pinéale du hamster syrien (**figure 41**). Ainsi, le retard observé dans l'induction de l'Aa-nat chez cette

espèce provient certainement du temps nécessaire à la transcription, puis à la traduction de ces deux protéines. Cependant, vu le manque de spécificité de la cycloheximide, nous ne pouvons pas exclure l'intervention d'autres facteurs de transcription activateurs dans ce mécanisme.



**Figure 41 : Rôle proposé de la balance temporelle d'expression de pCREB, ICER et des protéines AP-1 dans l'activation/répression de la transcription nocturne de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale de hamster syrien.** En début de nuit (zone bleue), l'activation rapide de CREB par la NA induit la synthèse des protéines c-FOS et c-JUN *via* la fixation de pCREB sur les sites CRE de leurs promoteurs. Les protéines c-FOS et c-JUN s'hétérodimérisent et pourraient induire la transcription de l'*Aa-nat* en se fixant sur les sites TRE et/ou CRE, en parallèle de l'action de pCREB sur les sites CRE. Parallèlement, c-FOS et c-JUN inhibent leur propre synthèse et leur expression commence à diminuer. En fin de nuit (zone violette), l'expression de c-FOS et c-JUN est nettement diminuée, ce qui réduit leur action sur les sites CRE et TRE, et donc la transcription de l'*Aa-nat*. En parallèle, la balance entre pCREB et ICER devient en faveur d'ICER, ce qui participe également à la diminution de la transcription de l'*Aa-nat*.

*Il reste maintenant à vérifier la réelle intervention des protéines c-FOS et c-JUN dans l'induction nocturne de l'Aa-nat. De plus, les dimères c-FOS/c-JUN étant activateurs à la fois sur les sites CRE et TRE, il serait intéressant de vérifier si leur action se fait via l'un et/ou l'autre de ces sites. A partir de la séquence du promoteur de l'Aa-nat chez le hamster syrien, il faudrait envisager l'étude du profil temporel de fixation de ces facteurs sur les sites CRE et TRE. Une étude de sous-expression et/ou de sur-expression de ces deux facteurs, par exemple in vitro avec des adénovirus codant des ARN interférants, nous renseignerait également sur leur rôle dans la glande pinéale du hamster syrien. Enfin, tout comme chez le rat, une étude des autres partenaires potentiels (autres protéines AP-1, ATF-2, NF-Y,...) nous permettrait de mieux comprendre les évènements transcriptionnels nocturnes ayant lieu chez le hamster.*

Notre étude révèle également que c-FOS et c-JUN sont induits par la libération nocturne de NA. En effet, l'administration d'antagonistes  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques diminue fortement l'expression de ces deux protéines. Leur forte dépendance à la stimulation  $\beta$ -adrénergique indique que leur expression est dépendante de pCREB : l'activation de ce dernier précède celle de c-FOS et c-JUN, et il est responsable de leur induction dans de nombreux autres systèmes cellulaires (Herdegen & Leah, 1998). Cependant, la stimulation de ces facteurs est également fortement dépendante de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans la glande pinéale de rat (Carter, 1997) et dans la plupart des autres systèmes cellulaires (Herdegen & Leah, 1998). Ceci pourrait expliquer l'effet important des antagonistes  $\alpha$ -adrénergiques sur leur induction (notre étude), mais également sur la transcription de l'Aa-nat (Garidou *et al.*, 2003b). *Il faudrait maintenant déterminer si la voie  $\alpha$ -adrénergique stimule directement la synthèse de ces protéines ou si elle n'a qu'un effet potentialisateur. Il serait intéressant de tester non seulement l'effet de la stimulation  $\alpha$ -adrénergique seule sur l'induction de ces facteurs, mais également de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sur des glandes pinéales en culture. De plus, notre étude n'ayant été faite que sur les protéines, il est nécessaire d'étudier la régulation de l'expression des ARNm de ces deux facteurs.*

Les résultats de notre étude suggèrent que l'activation de CREB en début de nuit par la NA stimule rapidement l'expression de c-FOS et c-JUN. Ces deux protéines dimérisent et induisent la transcription de l'Aa-nat, en conjonction avec pCREB, et assurent ainsi une stimulation maximale de la transcription de l'Aa-nat (**figure 41**).

## **II. Restriction diurne de la synthèse de mélatonine et de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien : une fenêtre temporelle d'inactivation régulée par des mécanismes multiples**

Un autre mécanisme semble intervenir pour restreindre la synthèse de mélatonine uniquement à la phase nocturne du nyctémère chez le hamster syrien. En effet, tous les protocoles mis en œuvre pour stimuler la synthèse de mélatonine durant le jour chez cette espèce ont échoué (Lipton *et al.*, 1982; Reiter *et al.*, 1987a; Reiter *et al.*, 1987b; Santana *et al.*, 1988a; Santana *et al.*, 1988b; Vaughan *et al.*, 1986; Vaughan *et al.*, 1987; Vaughan & Reiter, 1987). Ce phénomène n'existe pas chez le rat, il a été décrit chez l'homme (Berlin *et al.*, 1995; Vaughan, 1986), la souris (Chansard *et al.*, 2006; Fukuhara *et al.*, 2005) et le hamster d'Europe (Garidou *et al.*, 2003c), ce qui souligne l'importance de l'étude des mécanismes le régulant.

La restriction de la stimulation de la synthèse de mélatonine durant le jour chez le hamster est directement liée à une incapacité à induire la transcription de l'*Aa-nat*, que ce soit avec des injections aiguës ou avec des injections chroniques d'agonistes adrénergiques (Garidou *et al.*, 2003b). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène. Il est possible que l'incapacité à stimuler la transcription de l'*Aa-nat* soit causée par la forte expression d'une protéine inhibitrice durant le jour. En effet, l'injection de cycloheximide en milieu de nuit permet une induction de l'*Aa-nat* au début du jour suivant, suggérant donc l'intervention de la synthèse d'une protéine inhibitrice dans ce mécanisme (Garidou *et al.*, 2003b). Une autre hypothèse serait un blocage de la voie de signalisation adrénergique. Dans cette deuxième partie, nous avons testé ces deux hypothèses. Nous avons également cherché déterminer si ce mécanisme était endogène à la glande pinéale (au moyen d'un oscillateur interne), ou si l'horloge centrale le contrôlait au moyen d'un signal externe.

### **A. Un mécanisme général**

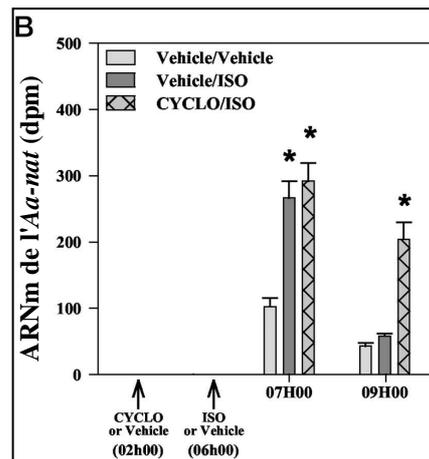
L'étude de la restriction diurne de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien n'a pas été une chose aisée. En effet, nous avons vu précédemment que l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* nécessite un délai d'environ 5 heures suite à la stimulation

noradrénergique. L'étude de ce mécanisme *in vivo* nécessite des protocoles d'injections chroniques contraignants, à la fois pour les expérimentateurs et pour les animaux. Nous avons donc utilisé d'autres gènes exprimés plus rapidement suite à la stimulation noradrénergique : *Icer*, dépendant essentiellement de la stimulation  $\beta$ -adrénergique, et *c-fos*, semblant dépendre à la fois des stimulations  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques, tous deux inductibles en une à deux heures. L'utilisation du gène *c-fos* est sans doute la plus intéressante, car celui-ci participe certainement directement à la régulation de la transcription de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale du hamster syrien (voir **section I.B.2 de cette discussion**).

La première constatation que nous avons pu faire est que la restriction ne concerne pas seulement l'*Aa-nat* (Garidou *et al.*, 2003b), mais également *Icer* et *c-fos* (**article 2**). En effet, l'induction de ces deux gènes en milieu de journée n'est pas possible suite à une injection *in vivo* d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique. Cette restriction persiste lorsque les animaux sont en DD, mais elle est levée lorsque les animaux ont été placés 3 jours en LL avant l'expérience. La même régulation avait été montrée pour l'*Aa-nat* (Garidou *et al.*, 2003b). L'ensemble de ces observations suggère que la restriction diurne ne concerne pas seulement l'*Aa-nat*, mais l'ensemble des gènes dont la transcription dépend de l'AMPc. Elle pourrait donc toucher l'activité générale de la glande pinéale.

### B. Un rôle pour ICER ?

L'intervention d'une protéine inhibitrice dans la répression diurne de la transcription de l'*Aa-nat* avait été suggérée, car l'injection d'un inhibiteur de synthèse protéique (cycloheximide) en milieu de nuit permet la stimulation de l'*Aa-nat* en début de jour suivant (**figure 42**, Garidou *et al.*, 2003b). Cependant, dans cette expérience, les animaux non injectés à la cycloheximide durant la nuit présentaient une induction de l'*Aa-nat* identique 1 heure après la stimulation par les agonistes adrénergiques, mais moins prolongée que pour les animaux traités à la cycloheximide. La stimulation ayant été faite une heure après le début du jour, à un moment où l'*Aa-nat* endogène est encore élevée, il est possible que la cycloheximide inhibe la synthèse de protéines nécessaires à la dégradation des ARNm de l'*Aa-nat*, stabilisant ainsi plus longtemps ces derniers. Un mécanisme similaire a été décrit dans la glande pinéale de rat, où des protéines spécifiques sont exprimées en fin de nuit et dégradent les ARNm de l'*Aa-nat*, participant ainsi à la diminution de son expression (Kim *et al.*, 2005b).



**Figure 42** : L'inhibition de la synthèse protéique en milieu de nuit permet d'induire une expression prolongée de l'ARNm de l'Aa-nat en début de jour suivant. Les animaux ont été injectés avec de la cycloheximide ou du solvant en milieu de nuit (02h00), puis avec de l'isoprotérénol (ISO) ou du solvant au début du jour suivant (06h00). L'expression de l'ARNm de l'Aa-nat a ensuite été mesurée par hybridation *in situ* 1 et 3 heures après l'injection matinale (07h00 et 09h00). (d'après Garidou *et al.*, 2003)

Dans le but de vérifier la potentielle participation d'une protéine inhibitrice dans la mise en place de la restriction diurne, nous avons testé l'effet de l'injection nocturne de cycloheximide sur l'induction diurne de l'Aa-nat et de *c-fos*, à un moment où leur expression endogène est minimale (**section II.C.2 des résultats**). Nos résultats montrent que l'injection de cycloheximide permet l'induction à la fois de *c-fos* et de l'Aa-nat en deuxième moitié de jour. Ceci confirme bien l'intervention de la synthèse d'une protéine durant la nuit qui serait responsable de l'inhibition de la transcription des gènes durant la deuxième moitié du jour suivant. De plus, cette protéine semble réprimer non seulement la transcription de l'Aa-nat, mais également la transcription d'autres gènes dépendants de l'AMPC (*c-fos*).

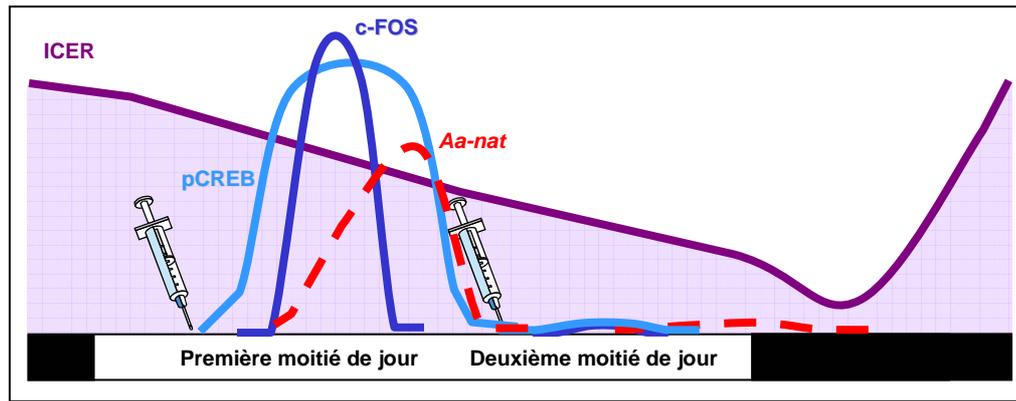
A la suite de ces résultats, nous avons étudié le rôle possible d'ICER dans la mise en place de la restriction diurne de la stimulation de l'Aa-nat chez le hamster syrien. ICER appartient à la famille des protéines CREM, mais diffère de celles-ci par le fait qu'il est induit par l'AMPC et ne possède pas de domaine de *trans*-activation. Ces propriétés en font un inhibiteur puissant de la transcription contrôlée par les séquences CRE, et dont l'activité ne dépend que de la quantité de protéines présentes (Foulkes *et al.*, 1996a; Molina *et al.*, 1993; Stehle *et al.*, 1993). Par ailleurs, ICER est un fort inhibiteur de sa propre transcription induite

par l'AMPC (voir **section III.C.3 de l'introduction**) et réprime également la transcription de *c-fos* (Misund *et al.*, 2007; Steigedal *et al.*, 2007). De plus, nos résultats montrent que l'expression d'ICER diminue fortement après 3 jours en LL (**section II.C.1 des résultats**). Ces observations nous ont amené à suggérer qu'ICER pourrait être impliqué dans la restriction de l'induction diurne de l'*Aa-nat*, *Icer* et *c-fos*.

Pour étudier cette hypothèse, nous avons caractérisé le profil d'expression journalier de la protéine ICER dans la glande pinéale de hamster syrien. Nos résultats (**article 2**) montrent que le rythme d'ICER observé dans la glande pinéale de hamster est semblable à celui observé chez le rat (Maronde *et al.*, 1999a). Son expression est élevée tout au long du nyctémère, mais avec des valeurs significativement plus élevées en fin de nuit/début de jour, qui diminuent progressivement en deuxième moitié de jour pour devenir minimales en début de nuit. Par contre, les valeurs en milieu de jour chez le hamster correspondent à environ 70% des valeurs maximales, alors que chez le rat, celles-ci sont d'environ 30%. Cette différence pourrait donc être suffisante pour expliquer pourquoi il est possible d'induire l'*Aa-nat* chez le rat et pas chez le hamster.

A partir de ce profil, nous avons supposé que la restriction diurne de l'expression des gènes devait avoir lieu durant toute la journée, voire être plus forte en début de jour. De plus, une étude précédente réalisée dans le laboratoire avait montré que l'induction de l'*Aa-nat* était possible durant le jour, mais restreinte à une courte fenêtre temporelle dans les deux heures suivant la fin de la nuit (Garidou *et al.*, 2003b). Des résultats semblables avaient été obtenus sur la mélatonine (Vaughan *et al.*, 1986; Vaughan *et al.*, 1987; Vaughan & Reiter, 1987). Cependant, il est important de préciser ici que les niveaux d'expression de l'*Aa-nat* et de la mélatonine ont été observés pour des stimulations faites une heure après le début du jour, c'est-à-dire à un moment où l'expression de l'*Aa-nat* endogène est encore élevée. Ainsi, les réponses observées lors de ces études pourraient résulter d'un phénomène de stabilisation de l'ARNm de l'*Aa-nat* par la stimulation noradrénergique.

Pour contourner ce problème, nous avons testé l'effet d'une stimulation adrénérgique 4 heures et 9 heures après le début du jour, c'est-à-dire à des points horaires où l'expression endogène de l'*Aa-nat*, d'*Icer* et de *c-fos* est minimale. De plus, en ce qui concerne l'étude de l'*Aa-nat*, nous avons utilisé un protocole d'injections chroniques sur 5 heures afin de laisser le temps à l'ARNm d'être synthétisé, au lieu des 1 ou 3 heures utilisées précédemment (Garidou *et al.*, 2003b). Nos résultats démontrent clairement une induction différentielle de ces gènes en fonction de l'heure de l'injection (**figure 43**, voir **article 2**), avec une induction possible en



**Figure 43** : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur la restriction diurne de l'activation de la glande pinéale chez le hamster syrien. L'induction (*ex vivo* et *in vivo*) de *c-fos* et de *Aa-nat* par des agonistes adrénergiques (seringues) est possible uniquement en première moitié de jour, lorsque l'expression de la protéine ICER est maximale. De plus, l'induction de pCREB n'est également possible qu'en première moitié de jour. Ces résultats suggèrent que la répression transcriptionnelle par ICER n'est pas la cause directe de la restriction diurne de l'induction des gènes dépendants de l'AMPc, mais que cette restriction serait due à une diminution de sensibilité de la signalisation adrénergique en deuxième moitié de jour.

première partie de journée (4 heures après le début du jour), mais pas en deuxième partie (7-9 heures après le début du jour). Il existe donc bien une fenêtre temporelle de restriction de la transcription dans la glande pinéale du hamster syrien, qui se met en place en deuxième partie de journée. Nous avons également confirmé ce résultat en utilisant des glandes pinéales en culture, prélevées à différents moments de la journée (voir **section III.A des résultats**). L'induction diurne des trois gènes étudiés ici est possible au moment où l'expression d'ICER est maximale (**figure 43**). C'est pourquoi nous considérons qu'ICER n'est pas responsable de cette restriction temporelle. En effet, si celle-ci était due à ICER, l'activation ne serait pas possible en début de jour et le serait faiblement en fin de jour.

Nous démontrons ici clairement l'existence d'une fenêtre étroite où la transcription des gènes dépendants de l'AMPc dans la glande pinéale de hamster syrien est impossible. Une telle fenêtre d'inactivation a également été observée dans la glande pinéale de souris (Fukuhara *et al.*, 2005). Cependant, son positionnement temporel est différent, car chez la souris, *Aa-nat* n'est pas stimulable en début de journée et le devient progressivement en fin de journée. Les raisons d'une telle différence sont encore inconnues.

### C. Un blocage de la signalisation adrénérergique ?

Suite à ces résultats, nous nous sommes demandé si la fenêtre d'inactivation de la transcription pouvait être due à une diminution de la sensibilité de la signalisation adrénérergique. Dans ce but, nous avons étudié l'activation de CREB comme marqueur car 1) la transcription de l'*Aa-nat* et de *c-fos* dépendent de pCREB, et 2) l'activation de CREB ne dépend pas de sa néosynthèse, mais uniquement de sa phosphorylation par la stimulation adrénérergique. Nous avons alors étudié l'induction de pCREB en première et deuxième moitié de journée. De manière surprenante, nous montrons que la stimulation de la phosphorylation de CREB est possible en première partie de jour, mais elle est nettement réduite en deuxième partie (**figure 43** et **article 2**). Ce résultat renforce notre conclusion selon laquelle ICER n'intervient pas dans ce mécanisme et démontre que la fenêtre d'inactivation ne concerne pas seulement la transcription des gènes, mais affecte l'activation générale de la glande pinéale par les agonistes adrénérergiques. Il existe donc un blocage dans la voie de signalisation, en amont de la phosphorylation de CREB, empêchant la transcription des gènes dépendant de l'AMPc. Par ailleurs, une étude a rapporté une induction possible de la synthèse de mélatonine dans des glandes pinéales prélevées une heure après le début du jour et mises en culture pour 8 heures (de 1 à 9 heures après le début du jour) avec de la forskoline (Santana *et al.*, 1990). La fenêtre d'activation matinale que nous mettons en évidence ici permet d'expliquer un tel résultat. En effet, l'activation de la voie  $\beta$ -adrénérergique étant possible en début de journée (nos résultats), la stimulation des glandes pinéales par la forskoline à cette période permet donc une accumulation de la mélatonine dans le milieu de culture, visible 8 heures après le début de la stimulation, même si la restriction s'est mise en place entre temps.

Les hypothèses permettant d'expliquer ce blocage de l'activité de la glande pinéale chez le hamster syrien sont nombreuses, car celui-ci pourrait impliquer tout élément intervenant dans la signalisation en amont de pCREB. L'impossibilité de stimuler la phosphorylation de CREB est en accord avec des études antérieures rapportant que des agonistes adrénérergiques ne stimulent ni l'activité électrique des pinéalocytes (Stehle *et al.*, 1989) ni l'accumulation d'AMPc dans des glandes pinéales en culture (Santana *et al.*, 1988a; Santana *et al.*, 1988c). Cette dernière constatation est intéressante car elle impliquerait un blocage au niveau même de la production d'AMPc, touchant soit l'Adénylate Cyclase, soit les récepteurs adrénérergiques. Un mécanisme similaire a été démontré dans la restriction temporelle de la synthèse de mélatonine dans la rétine, où l'inhibition de l'induction serait due à une diminution de l'activité

## *II. Restriction diurne de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien*

de l'Adénylate Cyclase (Fukuhara et al., 2004). Cependant, la stimulation *in vitro* de glandes pinéales de hamsters syrien, prélevées de jour, avec de la forskoline induit une forte production d'AMPc, mais pas la stimulation avec de l'isoprotérénol (Santana et al., 1988a; Santana et al., 1988c), suggérant plutôt un mécanisme au niveau du récepteur. Cependant, 8 isoformes d'Adénylate Cyclase sont exprimées dans la glande pinéale (Han et al., 2005), et la forskoline les stimule sans distinction. Il est donc possible qu'il existe une isoforme spécifique couplée au récepteur  $\beta$ -adrénergique et dont l'activité diminue en deuxième moitié de jour.

Ce blocage pourrait également provenir d'une modification de l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. En effet, une de nos études préliminaires réalisée en Western Blot révèle une expression maximale de ces récepteurs de nuit et en début de jour, et minimale en milieu de jour (résultat non montré). Cependant, l'association récepteur-ligand, augmente durant le jour pour devenir maximale en début de nuit, à l'inverse de la mise en place de la fenêtre de restriction (Pangerl et al., 1990). Néanmoins, le récepteur peut être présent et lier le ligand, mais ne pas induire la transduction du signal car non couplé à l'Adénylate Cyclase ou à la protéine G, ceci en fonction de son état de phosphorylation (Hall, 2004 pour revue).

La restriction de l'induction des gènes dépendants de l'AMPc que nous mettons en évidence chez le hamster ressemble fortement à la période réfractaire à l'induction de la voie générale de l'AMPc. Dans de nombreux systèmes, les cellules ne répondent plus à l'AMPc après une longue exposition à un stimulus (Montminy, 1997). Pendant cette période réfractaire, la stimulation de la voie de l'AMPc ne permet pas non plus de stimuler la phosphorylation de CREB, ce qui suggère une sur-expression et/ou une augmentation d'activité des phosphatases, ou encore une sous-régulation des sous-unités catalytiques de la PKA. Dans la lignée cellulaire de thyroïde de rat Fischer par exemple, cette période réfractaire se met en place *via* une diminution de l'expression des sous-unités catalytiques de la PKA (Armstrong et al., 1995). Par ailleurs, l'activité de la PKA peut également être inhibée par une protéine inhibitrice, la PKI ("Protein Kinase Inhibitor", Patten et al., 1991), dont l'augmentation d'expression en deuxième partie de jour pourrait expliquer à la fois pourquoi pCREB n'est pas inductible et l'effet de la cycloheximide observé dans nos expériences.

*Dans le but de déterminer les causes du blocage de l'activation de la signalisation noradrénergique, il serait intéressant d'étudier à la fois l'expression et l'activité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, de l'Adénylate Cyclase, de la PKA (sous-unités catalytiques) et des phosphatases dans la glande pinéale de hamster syrien. Nous avons réalisé des tests en immunohistochimie sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et l'Adénylate Cyclase, mais sans*

## *II. Restriction diurne de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien*

*résultats concluants car le signal était "noyé" dans le bruit de fond. L'utilisation de la technique de Western Blot pourrait alors s'avérer plus facile dans ce cadre. De plus, il serait intéressant de comparer l'effet de la stimulation directe des intermédiaires de la signalisation (par de la forskoline, des analogues de l'AMPc et de l'isoprotérénol) sur l'expression des gènes et de pCREB. Ceci pourra être fait sur des glandes pinéales en culture selon le protocole présenté dans la section III.B des résultats. Ces expériences permettraient de définir exactement où s'effectue le blocage.*

Pour terminer, je mentionnerai que cette restriction diurne de la phosphorylation de CREB a également été décrite dans la glande pinéale du rat (Roseboom & Klein, 1995). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'injection d'un agoniste adrénergique en milieu de jour n'induit pas la phosphorylation de CREB, ou du moins sa fixation sur les séquences CRE. Ceci explique certainement pourquoi l'induction d'*Icer* est impossible à cette même période, car elle ne dépend que de l'activation de CREB (**section III.C.3 de l'introduction**, Stehle *et al.*, 1993; Foulkes *et al.*, 1996a). En revanche, ce résultat est troublant car la transcription de l'*Aa-nat* est fortement stimulable à ce même moment. La différence pourrait provenir du fait que la transcription de l'*Aa-nat* ne dépend pas que des sites CRE, mais également des sites CCAAT (**section III.B et III.F.1 de l'introduction**, Baler *et al.*, 1997). *Il serait intéressant de vérifier si la même fenêtre de restriction existe chez le rat en étudiant, par immunohistochimie, l'induction de pCREB durant le jour.*

Néanmoins, ce résultat nous amène à nous poser la question de l'importance d'une voie annexe à la phosphorylation de CREB dans l'induction de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien. En effet, l'induction de l'*Aa-nat* ne dépend peut-être pas des sites CCAAT, ce qui expliquerait alors la différence dans l'induction diurne chez ces deux espèces. *Ce point serait intéressant à vérifier en réalisant par exemple une mutation de ce site dans le promoteur de l'*Aa-nat* chez le hamster et en étudiant l'effet de cette mutation sur l'induction de l'*Aa-nat*.*

### **D. Un mécanisme régulé par un oscillateur interne à la glande pinéale?**

La fenêtre temporelle de restriction de la signalisation noradrénergique que nous mettons en évidence dans nos expériences n'est pas un phénomène unique. En effet, la sensibilité des voies de signalisation du glutamate et du PACAP dans les NSC varie en fonction du nyctémère (Gillette & Mitchell, 2002), de même que la voie de l'AMPc dans la rétine de rat

## II. Restriction diurne de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien

(Fukuhara *et al.*, 2004). Dans ces deux structures, ce phénomène serait régulé directement par les oscillations autonomes des gènes horloge. Par ailleurs, une telle fenêtre de restriction de l'induction de l'*Aa-nat* a été décrite dans la glande pinéale de souris (Fukuhara *et al.*, 2005). Cette dernière diffère cependant de celle que nous mettons en évidence chez le hamster syrien, car l'induction est ici possible en deuxième partie de journée, mais pas en première. Dans cette étude, les auteurs ont supposé que ce phénomène dépendait de l'expression d'un oscillateur endogène. En effet, la glande pinéale de souris, mais également de rat, exprime les gènes horloge de manière rythmique (voir **section III.E de l'introduction générale**). De plus, la restriction de l'induction de l'*Aa-nat* mise en évidence dans la glande pinéale de souris est maintenue lorsque les glandes sont mises en culture, en parallèle des oscillations de *perl* (Fukuhara *et al.*, 2005). D'après ces observations, il est légitime de se demander si la mise en place de la restriction de la signalisation noradrénergique que nous avons mis en évidence chez le hamster syrien dépend d'un oscillateur interne à la glande pinéale.

Les gènes horloge sont également exprimés de manière rythmique dans la glande pinéale du hamster syrien (Wongchitrat *et al.*, article soumis). Nos résultats montrent que la restriction de la signalisation noradrénergique chez cette espèce disparaît après un jour en LL et après 24 heures en culture (**article 2** et **section III.C des résultats**). Ceci suggère que le mécanisme est différent de celui observé chez la souris : il ne semble pas contrôlé par un oscillateur. Néanmoins, une étude récente réalisée au laboratoire a démontré que l'expression de *rev-erba* et de *bm11* continuait à osciller dans des glandes pinéales de hamster en culture et *in vivo* en LL (Wongchitrat *et al.*, article soumis). Ces observations donnent donc une réalité à cette notion d'oscillateur interne à la glande pinéale chez le hamster syrien. Cependant, ce dernier n'apparaît pas totalement autonome, car les oscillations de *perl* et *cry2* disparaissent en LL. Ainsi, la disparition du phénomène de restriction en LL chez le hamster pourrait être due à une désorganisation de cet oscillateur. Ce dernier semble dépendant d'un contrôle par l'horloge car la restriction persiste en DD (voir **article 2**).

Comment les gènes horloge pourraient être impliqués dans la mise en place de cette fenêtre de restriction ? Nous avons vu que chez le rat, ces gènes ne semblaient pas intervenir directement dans la régulation de l'expression de l'*Aa-nat*, car une mutation des E-box du promoteur n'a aucun effet sur son rythme d'expression (Humphries *et al.*, 2007). Cependant, ce contrôle pourrait se faire par la régulation de facteurs intervenant dans la voie de signalisation induisant la synthèse de l'*Aa-nat*. Dans la rétine de rat, la restriction de la synthèse de mélatonine semble due à une diminution de l'activité de l'Adénylate Cyclase 1

## *II. Restriction diurne de la synthèse de mélatonine chez le hamster syrien*

(Fukuhara *et al.*, 2004). Le promoteur de l'Adénylate Cyclase 1 contient une E-box fonctionnelle pour l'induction de la transcription du gène (Chan *et al.*, 2001). De plus, l'expression de son ARNm est inhibée de nuit par la NA dans la glande pinéale de rat, et cette inhibition est abolie en LL (le pic se prolonge durant le jour, Tzavara *et al.*, 1996). Ainsi, l'induction de PER1 et CRY2 par la NA pourrait réprimer la synthèse de l'Adénylate Cyclase 1 conduite par les dimère CLOCK/BMAL1. L'expression diminue donc et devient minimale en fin de nuit. Dans notre modèle, ce mécanisme pourrait diminuer l'expression de l'Adénylate Cyclase 1 en deuxième moitié de jour et être responsable du blocage observé dans la voie de signalisation. Si les animaux sont placés en LL, PER1 et CRY2 ne sont pas induits (Wongchitrat *et al.*, article soumis) et donc la synthèse de l'Adénylate Cyclase 1 n'est pas diminuée. De plus, cette hypothèse explique également l'effet de la cycloheximide en milieu de nuit (voir **section II.C.2 des résultats**). En effet, celle-ci inhiberait la synthèse de PER1 et CRY2, qui n'exerceraient alors pas leur action répressive. L'Adénylate Cyclase 1 continuerait à être présente et le blocage en milieu de jour n'aurait pas lieu.

*Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier la possible implication des produits des gènes horloge dans la mise en place de la fenêtre de restriction. Ceci pourrait être réalisé par l'utilisation du modèle ex vivo que nous avons commencé à mettre au point, en conjonction avec une sous-expression des protéines PER et CRY.*

La disparition de la restriction diurne en LL ou suite à 24 heures de culture (nos résultats) et sa persistance en DD suggèrent que l'horloge centrale contrôle la mise en place de ce phénomène (et donc l'oscillateur interne) dans la glande pinéale. Comment pourrait se faire un tel contrôle ? La libération nocturne de NA semble être un bon candidat car 1) elle constitue le signal majeur par lequel l'horloge régule la synthèse de mélatonine et le métabolisme de la glande pinéale, 2) elle régule l'expression de certains gènes horloge (*per1* et *cry2*) dans la glande pinéale de rat, de souris (Fukuhara *et al.*, 2000; Simonneaux *et al.*, 2004; Takekida *et al.*, 2000) et de hamster syrien (Wongchitrat *et al.*, article soumis), 3) la NA contrôle les oscillations des gènes horloge, notamment *per1*, dans les glandes surrénales et le foie (Ishida *et al.*, 2005; Terazono *et al.*, 2003), mécanisme régulant la sensibilité journalière des glandes surrénales à l'ACTH (Oster *et al.*, 2006).

Nos expériences n'ont cependant pas permis de mettre en évidence un tel rôle pour la NA. Nous avons tenté de mimer artificiellement le contrôle noradrénergique nocturne de l'horloge en soumettant des glandes pinéales de hamster syrien à une ou deux périodes de 10 heures de stimulation avec de la NA (voir **section III.C des résultats**). Cependant, ce traitement s'est

révélé inefficace dans la mise en place de la restriction, car l'activité des glandes pinéales a été stimulée, que celles-ci aient été incubées avec la NA ou non. Il faut toutefois rester prudent avec ces expériences, car elles ne comportaient pas un nombre suffisant de glandes pinéales pour pouvoir conclure avec certitude. Par ailleurs, il est probable que nos conditions de culture ne reproduisent pas complètement la nuit endogène à laquelle sont soumis les animaux *in vivo*. En effet, les glandes pinéales étant prélevées le matin, elles sont coupées très tôt de nombreux signaux pouvant influencer leur métabolisme, et le seul auquel elles sont soumises à nouveau est la NA. Or, de tels signaux contrôlés par l'horloge, pourraient également être impliqués dans la mise en place de la restriction diurne. Par exemple, l'oscillateur du foie est également contrôlé par les NSC *via* l'action des glucocorticoïdes (Balsalobre *et al.*, 2000). Ceux-ci pourraient alors intervenir dans la mise en place de la restriction de l'activation de la glande pinéale, par exemple en contrôlant l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. En effet, une adrénalectomie augmente la liaison maximale récepteur-agoniste observée en début de journée dans la glande pinéale de rat (Gonzalez-Brito *et al.*, 1988d).

Pour finir, il est également probable que la mise en place de la restriction diurne ne dépende pas d'un oscillateur interne à la glande pinéale, mais d'un signal inhibiteur diurne contrôlé par l'horloge. Ceci permettrait également d'expliquer pourquoi la restriction disparaît en culture chez le hamster syrien.

### III. Contrôle photopériodique de l'expression de l'Aa-nat : une diminution dans l'efficacité de la transcription

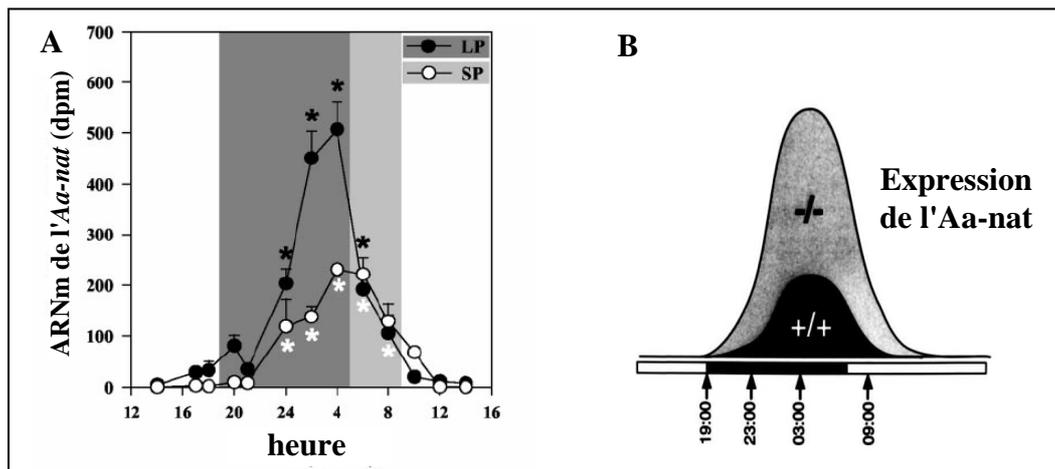
La mélatonine délivre un message temporel à l'organisme par la variation de sa durée de présence dans le plasma, en relation avec la durée de la nuit. Chez la plupart des espèces, cette variation est directement contrôlée par la durée de l'activité nocturne de l'AA-NAT. Chez les rongeurs, l'allongement de l'activité nocturne de l'AA-NAT est directement dépendant d'un allongement de la transcription de l'Aa-nat. Chez certains rongeurs, l'amplitude du pic de mélatonine varie également, pour augmenter en photopériode courte, essentiellement grâce à une augmentation de l'activité de l'HIOMT (voir **section II de l'introduction**). Cette augmentation de synthèse de mélatonine est également associée, chez le rat et le hamster sibérien, à une diminution de l'amplitude du rythme de l'Aa-nat. Chez le hamster syrien, les

variations dans la synthèse de mélatonine sont également caractérisées par un allongement de la durée de transcription de l'*Aa-nat*, ainsi que par une forte diminution de l'amplitude du pic (**figure 44**). Cependant, alors que chez le rat et le hamster sibérien le délai d'induction de l'*Aa-nat* et de la synthèse de mélatonine augmente avec l'allongement de la durée de la nuit (voir **section II de l'introduction**), ce délai ne varie pas en fonction de la photopériode chez le hamster syrien (Garidou *et al.*, 2003b; Miguez *et al.*, 1995; Reiter, 1993a).

#### A. Un rôle pour ICER ?

Nous avons supposé l'intervention d'ICER dans la diminution d'amplitude du pic nocturne de l'ARNm de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien pour plusieurs raisons : 1) la mutation d'ICER chez la souris *in vivo* induit une forte augmentation de l'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* (**figure 44**, Foulkes *et al.*, 1996a), 2) la surexpression d'ICER dans des pinéaloctes de rat en culture inhibe fortement l'induction de l'*Aa-nat* (Ho *et al.*, 2007b), et 3) ICER est une protéine très stable et sa synthèse est plus longue en photopériode courte, ce qui augmente les quantités de protéines présentes en photopériode courte (Foulkes *et al.*, 1996b). Ainsi, selon notre hypothèse, la diminution de l'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* en photopériode courte serait due à une présence plus importante de la protéine ICER durant la nuit en photopériode courte.

Notre première étude montrait que la durée de synthèse de l'ARNm d'*Icer* dans la glande pinéale du hamster syrien est allongée en photopériode courte, supposant une synthèse plus longue de la protéine et donc des quantités plus importantes (Diaz *et al.*, 2003). Nous montrons que, contrairement à ce qui a été décrit chez le rat, le profil d'expression de la protéine ICER ne varie pas en fonction de la photopériode (**article 2**). De plus, les quantités de protéines ne sont pas plus importantes en photopériode courte, excluant donc qu'ICER soit responsable de la diminution d'expression de l'*Aa-nat* en photopériode courte. Ce résultat n'est pas très surprenant. En effet l'amplitude d'expression de l'ARNm d'*Icer* en photopériode courte et en photopériode longue est exactement la même (Diaz *et al.*, 2003). L'induction d'*Icer* étant très sensible (beaucoup plus que l'*Aa-nat*) à l'effet répresseur de sa propre protéine, si la quantité avait été augmentée, alors l'expression de son ARNm aurait été fortement diminuée. Le profil d'expression d'ICER chez le hamster syrien montre également un niveau faible en début de nuit dans les deux photopériodes. Ceci est en accord avec le fait que l'induction de la transcription de l'*Aa-nat* (et d'*Icer*) chez le hamster n'est pas décalée comme chez le rat, où ICER est plus fortement présent en début de nuit en photopériode courte. Les



**Figure 44 : Le blocage diurne de l'induction de l'Aa-nat serait dû à la synthèse d'une protéine inhibitrice durant la nuit précédente.** (A) Variations photopériodiques de l'expression de l'ARNm de l'Aa-nat dans la glande pinéale de hamster syrien. L'amplitude du rythme est nettement diminuée en photopériode courte (ronds blancs) par rapport à la photopériode longue (ronds noirs). L'induction de l'expression en début de nuit a lieu avec le même délai dans les deux photopériodes. La terminaison de l'expression est initiée par l'arrivée de la lumière en photopériode longue et par l'horloge endogène en photopériode courte. (B) Effet de la sous-expression d'ICER sur le rythme d'expression de l'Aa-nat dans la glande pinéale de souris. La mutation d'ICER (-/-) induit une nette augmentation de l'amplitude du rythme par rapport aux souris sauvages (+/+). Cependant les profils d'induction et de terminaison de l'expression restent identiques. (d'après Garidou *et al.*, 2003 (A) et Foulkes *et al.*, 1996 (B)).

raisons de cette différence de profil d'ICER en photopériode courte entre le rat et le hamster sont inconnues. Elles pourraient être dues à une régulation différente de la dégradation de la protéine, peut-être par une activité différente des protéasomes chez les deux espèces. Il est également intéressant de noter qu'une étude récente a également rapporté un profil photopériodique de la protéine ICER, avec des quantités généralement plus faible en photopériode courte, mais également une faible quantité de protéine en début de nuit (Maronde *et al.*, 2007). Bien que différent, ce profil reste en accord avec notre conclusion selon laquelle la diminution de l'expression de l'ARNm de l'Aa-nat chez le hamster syrien en photopériode courte n'est pas due à une répression par ICER.

Le rôle d'ICER chez le hamster reste donc encore à éclaircir. Il pourrait aider à la diminution de la transcription de l'Aa-nat en fin de nuit, en conjonction avec la diminution de l'expression de pCREB (figures 38 et 41, voir section I.A de cette discussion). Néanmoins, nos résultats suggèrent que la diminution d'amplitude du rythme d'expression de l'Aa-nat en photopériode courte dépend d'un autre mécanisme qu'une répression par ICER.

## B. Une diminution de la sensibilité de la voie noradrénergique ?

Pour déterminer si cette diminution d'expression de l'Aa-nat en photopériode courte pouvait être due à une diminution de la sensibilité de la signalisation noradrénergique, nous avons étudié l'expression photopériodique d'autres facteurs de transcription intervenant dans l'induction de l'Aa-nat. Nous avons observé que le profil temporel d'expression de pCREB et de c-FOS ne variait pas ou très peu avec la photopériode. En revanche leur amplitude est nettement diminuée en photopériode courte par rapport à la photopériode longue. Il semble donc que la diminution d'amplitude de l'expression de l'Aa-nat soit causée principalement par une diminution de la sensibilité de la signalisation noradrénergique en photopériode courte. Cependant, cela n'explique pas pourquoi l'amplitude du pic de l'ARNm et de la protéine ICER restent identiques dans les deux photopériodes (Diaz *et al.*, 2003). ICER étant très sensible à la stimulation  $\beta$ -adrénergique, il est probable que la quantité de CREB phosphorylée en photopériode courte soit suffisante pour en induire une expression maximale. Nous avons également observé que le délai d'induction nocturne de ces deux facteurs est identique quelle que soit la photopériode, ce qui explique pourquoi le délai d'induction de l'Aa-nat ne varie pas. Ce résultat nous indique également que la dynamique de libération de la NA en début de nuit semble identique dans les deux photopériodes.

La diminution de sensibilité de la voie adrénérgique en photopériode courte pourrait provenir d'une diminution de la quantité de NA libérée, dépendante de modifications photopériodiques dans le fonctionnement de l'horloge centrale. Il est également possible qu'elle soit causée par une diminution de l'expression des récepteurs  $\alpha$ - (diminution de la potentialisation) et/ou  $\beta$ -adrénergiques, de l'Adénylate Cyclase, de la PKA... Il est intéressant de noter qu'un mécanisme similaire a été mis en évidence dans la glande pinéale de rat. En effet, la diminution de sensibilité de la voie adrénérgique existe également en début de nuit en photopériode courte, avec une diminution de la phosphorylation de CREB (Foulkes *et al.*, 1996b), qui ne semble pas due à une diminution de production d'AMPc, mais à une diminution d'activité de la PKA (Engel *et al.*, 2004a).

*Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de déterminer le profil d'expression et d'activité photopériodique de ces différentes protéines (récepteurs adrénérgiques, Adénylate Cyclase, PKA,...) dans la glande pinéale du hamster syrien. L'étude de leur activité pourrait se faire en culture, sur des glandes prélevées chez des animaux préalablement acclimatés dans les deux photopériodes. La stimulation directe des différents intermédiaires de la voie de signalisation permettrait alors de déterminer le niveau auquel se fait cette*

### *III. Contrôle photopériodique de l'expression de l'Aa-nat chez le hamster syrien*

*diminution de sensibilité. De plus, il apparaît également essentiel d'étudier le profil photopériodique de libération de la NA in vivo (aspect temporel et quantitatif), par exemple par microdialyse.*

Les points discutés précédemment n'ont pris en compte que l'implication de la voie noradrénergique. Cependant, la glande pinéale est innervée par d'autres afférences pouvant moduler la synthèse de mélatonine et l'activité des enzymes la catalysant (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Parmi celles-ci, les afférences NPYergiques semblent particulièrement intéressantes. Le NPY est majoritairement colocalisé avec la NA dans les fibres sympathiques et semble être libéré simultanément avec celle-ci (Moller *et al.*, 1998). Son action sur la synthèse de mélatonine peut se faire par une inhibition de la libération de NA et/ou une de l'accumulation d'AMPc induite par la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Olcese, 1991; Rekasi *et al.*, 1998; Simonneaux *et al.*, 1994; Simonneaux *et al.*, 1999). Ainsi, il diminue l'activité de l'AA-NAT induite par la NA, *in vivo* et *in vitro* (Simonneaux & Ribelayga, 2003, pour revue). De plus, l'innervation NPYergique montre des variations saisonnières importantes chez le hamster d'Europe, avec une densité plus forte en hiver (Moller *et al.*, 1998).

Le NPY pourrait ainsi moduler la sensibilité de la signalisation adrénergique chez le hamster syrien en fonction des saisons. En effet, il est possible que l'innervation NPYergique soit plus dense en photopériode courte, expliquant la diminution dans l'expression des facteurs dépendant de l'AMPc (pCREB et c-FOS). De plus, bien qu'inhibant l'AA-NAT, le NPY n'a aucun effet sur l'expression d'ICER (Pfeffer *et al.*, 1999), ce qui est également en accord avec les quantités de protéines ICER qui ne changent pas avec la photopériode dans notre étude. *Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer si la densité de l'innervation NPYergique varie avec la photopériode chez cette espèce, ce qui est réalisable par immunohistochimie. Puis, il serait nécessaire d'étudier l'effet du NPY sur la transcription de l'Aa-nat. Ceci est envisageable à la fois in vitro sur des glandes pinéales en culture co-stimulées avec du NPY et de la NA, mais également in vivo en injectant un antagoniste des récepteurs au NPY en début de nuit à des hamsters syrien en photopériode courte.*

Bien que le NPY soit une cible intéressante, d'autres neurotransmetteurs et neuropeptides, dont la densité de l'innervation peut varier en fonction de la photopériode (exemple de la vasopressine) pourraient être impliqués dans la modulation photopériodique de l'expression de l'Aa-nat (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Par ailleurs, cette diminution d'expression n'ayant pas d'impact sur l'amplitude de la synthèse de mélatonine, il serait intéressant d'étudier si l'activité de l'HIOMT varie également chez cette espèce, comme cela a été démontré chez le hamster sibérien et le hamster d'Europe (voir **section II.E de l'introduction générale**).

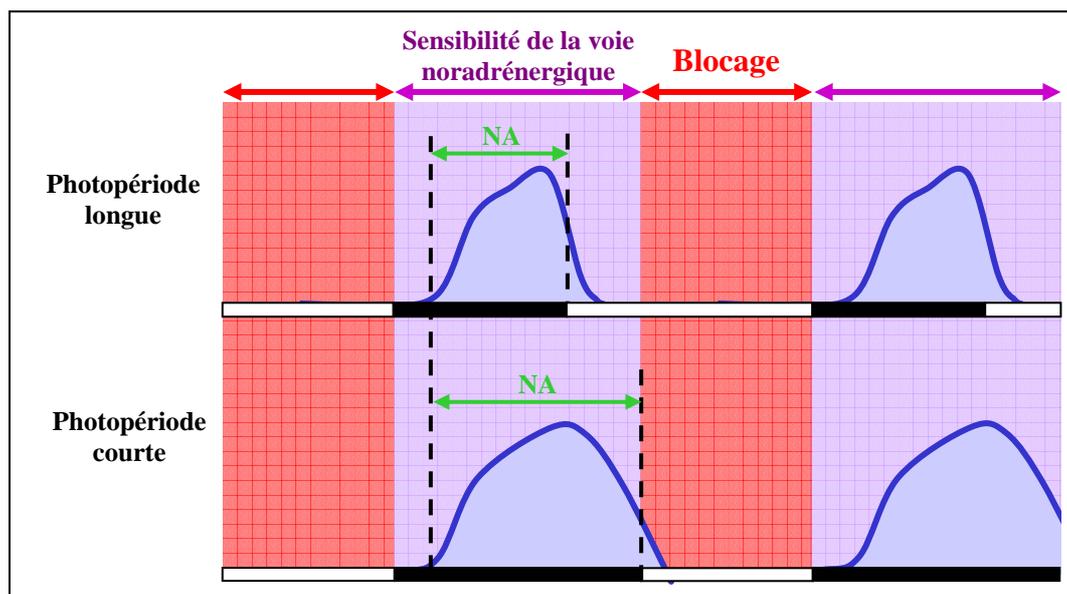
## **IV. Implication de ces mécanismes dans la construction du message photopériodique véhiculé par la mélatonine**

La construction du message photopériodique est principalement réalisée au sein même de l'horloge biologique des NSC (voir **section I.B de l'introduction générale**). Le fonctionnement de l'horloge (photosensibilité, activité électrique, expression des gènes horloge,...) est modifié en fonction de la photopériode, ce qui lui permet de délivrer un message temporel cohérent avec la photopériode ambiante (voir **section I.B de l'introduction générale**). Ceci permet alors la modification de l'expression des signaux de sortie de l'horloge, par exemple l'expression de l'ARNm de l'*AVP*. Ces observations ont suggéré que le contrôle photopériodique de la synthèse de mélatonine par l'horloge passait par une modification du profil de libération de la NA, bien qu'aucune donnée disponible ne permette de l'affirmer. Cependant, lors d'un changement de photopériode, l'horloge met environ 3 semaines à adapter son fonctionnement (Vuillez *et al.*, 1996), ce qui est également le temps nécessaire aux modifications de la durée du pic nocturne d'activité de l'AA-NAT dans la glande pinéale. Cette dernière apparaît alors comme un relais passif des NSC dans la construction du message saisonnier.

Néanmoins, la restriction diurne de la stimulation adrénergique suggère que la glande pinéale du hamster syrien pourrait participer activement au codage de cette information véhiculée par les NSC. En effet, il est intéressant de noter que la fenêtre d'activation matinale observée dans la glande pinéale du hamster syrien correspond au moment où la nuit et la synthèse de mélatonine s'allongent en photopériode courte (en prenant comme référentiel le début de la nuit). Ainsi, la glande pinéale participerait activement (et non comme un simple relais) à l'élaboration du message saisonnier, en permettant un allongement de la durée de synthèse de mélatonine. Ceci suppose que l'horloge centrale, étant responsable de la mise en place de la fenêtre de restriction, établisse une période de sensibilité à la NA identique dans les deux photopériodes (**figure 45**). Ainsi, en photopériode courte, l'arrêt de la synthèse de mélatonine serait dû à la diminution de la sensibilité de la voie noradrénergique, alors qu'en photopériode longue il serait dû à l'arrêt de la libération de NA par l'horloge.

#### IV. Construction du message photopériodique véhiculé par la mélatonine

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait tout d'abord nécessaire d'encadrer avec précision la fenêtre de restriction diurne de l'activation de la glande pinéale chez le hamster syrien. Ensuite, il serait intéressant de simuler l'allongement de la nuit par des injections d'agonistes adrénergiques chez des animaux en photopériode longue et en photopériode courte, afin de voir s'il est possible de prolonger artificiellement le pic de mélatonine. Si la théorie est correcte, le pic de mélatonine devrait pouvoir être prolongé durant la matinée en photopériode longue, mais pas en photopériode courte, car les injections seraient faites au moment de la mise en place de la restriction. Cette dernière étude sur les animaux en photopériode courte nous permettra également de vérifier si cette restriction existe durant le jour dans cette photopériode. Si elle existe, et qu'elle dépend uniquement de la libération nocturne de NA, sa mise en place devrait se faire presque immédiatement après le début du jour en photopériode courte.



**Figure 45 : Modèle expliquant le rôle de la fenêtre temporelle de restriction diurne dans le codage de l'information photopériodique par la glande pinéale chez le hamster syrien.** Selon notre modèle, la libération nocturne de NA (flèches vertes) débute au même moment dans les deux photopériodes. Ce signal permettrait à l'horloge centrale de diriger la mise en place des périodes de sensibilité de la voie noradrénergique (en violet) et de blocage (en rouge). L'arrêt de la libération de NA en photopériode longue est responsable de l'arrêt de la synthèse de mélatonine (courbe bleue). En revanche, en photopériode courte, la période de sensibilité permet l'allongement du pic de synthèse de mélatonine qui se terminerait grâce à la mise en place du blocage.

La restriction temporelle de la synthèse de mélatonine est très importante chez le hamster syrien, car sa physiologie varie avec les saisons, et donc avec la durée de présence de la mélatonine dans le plasma. Plus que la durée, c'est la coïncidence entre différentes périodes de présence de la mélatonine qui est importante (voir **section I.D de l'introduction**). En quoi une fenêtre temporelle de restriction de la synthèse de cette hormone peut-elle être utile chez cette espèce ? L'injection de mélatonine exogène (pendant plusieurs semaines) en fin de journée à des hamster syriens en photopériode longue induit une physiologie de type photopériode courte (Tamarkin *et al.*, 1976). La restriction de la synthèse de mélatonine durant la deuxième moitié de la journée, associée au long délai nécessaire à son induction, pourrait ainsi éviter la présence de mélatonine à un moment inapproprié. Bien que la glande pinéale du hamster syrien possède également un système de recapture de la NA endogène très efficace de jour (Vaughan *et al.*, 1986), l'exposition à un stress, induisant une forte libération de NA et d'adrénaline dans l'organisme, pourrait constituer un message d'erreur susceptible d'induire la mélatonine (Champney *et al.*, 1985). La mise en place de cette restriction pourrait permettre d'éviter cela, et donc n'autoriser la synthèse de mélatonine que durant la période nocturne.

## V. Conclusion et perspectives

L'ensemble des études réalisées au cours de ma thèse visait à analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la restriction temporelle de l'expression de l'*Aa-nat*, l'enzyme limitante de la synthèse nocturne de mélatonine, chez le hamster syrien. Dans ce cadre, nous avons démontré que :

1) la nature et la balance temporelle d'expression nocturne des facteurs de transcription régulant l'initiation/répression de la transcription de l'*Aa-nat* sont différentes de celles observées chez le rat, avec un rôle important des protéines c-FOS et c-JUN dans l'activation en début de nuit, expliquant le délai supplémentaire dans l'induction de l'expression de l'*Aa-nat* et de la synthèse de mélatonine chez le hamster ;

2) la restriction diurne de l'induction de l'*Aa-nat* est due à la mise en place d'une fenêtre d'inactivation de la signalisation noradrénergique en deuxième partie de journée, causant un blocage général de l'activation de la glande pinéale ;

3) l'absence de variations photopériodiques dans le délai d'induction nocturne de la transcription de l'*Aa-nat* est due à un profil temporel d'expression identique des intermédiaires de la voie de signalisation en début de nuit (pCREB et c-FOS) ;

4) la nette diminution de l'amplitude du rythme d'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat* en photopériode courte est causée par une diminution générale de la sensibilité de la signalisation noradrénergique.

Afin de continuer la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de ces phénomènes, plusieurs études sont envisageables :

- Le clonage du promoteur de l'*Aa-nat* chez le hamster nous renseignera tout d'abord sur la nature des séquences régulatrices contenues dans celui-ci. Ceci permettra alors d'étudier le profil temporel de fixation (donc d'activité) des protéines pCREB, ICER, c-FOS et c-JUN, ainsi que la manière dont ces facteurs entrent en compétition pour ces différentes séquences (CRE, TRE,...). Par ailleurs, l'étude des interactions entre ces différents facteurs (et avec d'autres partenaires) sera également intéressante pour comprendre leur mode d'action.

- L'inhibition spécifique de ces facteurs de transcription nous renseignera sur le rôle qu'ils exercent (activation ou répression) et leur importance dans la régulation de la transcription de l'*Aa-nat* chez le hamster (mais également chez le rat). Pour cela, l'utilisation de vecteurs adénoviraux codant des ARN interférents dirigés contre les ARNm de ces facteurs, en complément du modèle *ex vivo* que nous avons proposé, pourrait s'avérer un outil très efficace. Une collaboration a déjà été mise en place avec le laboratoire du Dr Anthony HO à Edmonton pour la construction de tels vecteurs.

- L'étude du profil temporel d'expression et d'activation des différents intermédiaires de la voie de signalisation noradrénergique nous permettra de définir précisément le niveau auquel la restriction diurne se met en place. L'utilisation d'un modèle *in vitro/ex vivo*, permettant de stimuler ces différents acteurs séparément, sera également très utile. A partir de ces données, il faudra alors caractériser la (les) protéine(s) inhibitrice(s) potentiellement responsable(s) de la mise en place de cette restriction.

- L'étude du profil photopériodique de libération de la NA, mais également d'autres médiateurs comme le NPY, en association avec l'étude du profil photopériodique d'expression et d'activation des différents acteurs de la signalisation noradrénergique, permettrait de comprendre les mécanismes responsables de la diminution de sensibilité de cette dernière en photopériode courte.

L'ensemble de nos résultats, en complément d'études antérieures, tend à montrer que la restriction temporelle de la synthèse de mélatonine est contrôlée de manière beaucoup plus stricte chez le hamster syrien, un rongeur à physiologie saisonnière, que chez le rat. Ceci est notamment possible grâce à la mise en place chez cette espèce d'une période de sensibilité à la NA, directement contrôlée par l'horloge centrale, permettant non seulement d'interdire la synthèse de mélatonine à certains moments du cycle jour/nuit, mais également de prolonger celle-ci suivant la photopériode. Il reste cependant à caractériser plus en détail la fenêtre de restriction mise en évidence lors de cette thèse. Pour cela, il faudrait notamment définir précisément l'aspect temporel de la mise en place de cette fenêtre, mais également vérifier son existence dans les deux photopériodes. Par ailleurs il apparaît nécessaire de comprendre comment l'horloge des NSC contrôle la mise en place de cette période de sensibilité de la signalisation noradrénergique de la glande pinéale à la NA. Pour cela, il est important de continuer la mise au point du modèle visant à reproduire la restriction dans des glandes pinéales *ex vivo* que nous avons débutée ici. En effet, ce modèle nous permettrait de soumettre les glandes pinéales à différents signaux (nocturnes ou diurnes) potentiellement utilisés par l'horloge afin de contrôler la mise en place de ce phénomène.

Par ailleurs, ce phénomène de restriction temporelle de la sensibilité d'une voie de signalisation induite par un modulateur n'est pas unique à la glande pinéale de hamster syrien. Une telle fenêtre de restriction a également été décrite dans la glande pinéale de souris et dans la rétine de rat, mais également dans les glandes surrénales ou au niveau de l'horloge elle-même. Cependant, dans ces modèles, la restriction semble dépendre directement d'un oscillateur interne à ces structures, synchronisé par un signal venant de l'horloge. La présence et l'importance d'un tel oscillateur dans la mise en place de la restriction diurne reste donc à démontrer chez le hamster. L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place de la fenêtre temporelle d'inactivation de la voie noradrénergique dans la glande pinéale du hamster syrien pourrait permettre de comprendre comment l'horloge contrôle l'expression des rythmes à la périphérie.

De plus, ces études pourraient s'avérer utiles dans le domaine de la chronopharmacologie, afin de comprendre pourquoi certaines drogues sont moins efficaces à certaines périodes du nyctémère.

*Références  
bibliographiques*



# A

Abe H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M & Honma K (1998) Circadian rhythm and light responsiveness of *bmal1* expression, a partner of mammalian clock gene *clock*, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci Lett* 258:93–96.

Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M & Block GD (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22:350–356.

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

Agez L, Laurent V, Pévet P, Masson-Pévet M & Gauer F (2007) Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 144:522–530.

Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH & Kyriacou CP (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12:540–550.

Albrecht U, Sun ZS, Eichele G & Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mPER1 and mPER2, to light. *Cell* 91:1055–1064.

Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS & Lee CC (2001) mPER1 and mPER2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* 16:100–104.

Albus H, Bonnefont X, Chaves I, Yasui A, Doczy J, van der Horst GTJ & Meijer JH (2002) Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol* 12:1130–1133.

Alonso R, Abreu P, Fajardo N, Hernández-Díaz F, Díaz-Cruz A, Hernández G & Sánchez-Criado J (1995) Ovarian hormones regulate alpha 1- and beta-adrenoceptor interactions in female rat pinealocytes. *Neuroreport* 6:345–348.

Andres-Barquin PJ, Hernandez MC & Israel MA (2000) Id genes in nervous system development. *Histol Histopathol* 15:603–618.

Angelis JD, Gastel J, Klein DC & Cole PA (1998) Kinetic analysis of the catalytic mechanism of serotonin N-acetyltransferase (ec 2.3.1.87). *J Biol Chem* 273:3045–3050.

Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH & Takahashi JS (1997) Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89:655–667.

Appelbaum L, Toyama R, Dawid IB, Klein DC, Baler R & Gothilf Y (2004) Zebrafish serotonin-N-acetyltransferase-2 gene regulation: pineal-restrictive downstream module contains a functional e-box and three photoreceptor conserved elements. *Mol Endocrinol* 18:1210–1221.

Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J & Montminy M (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370:226–229.

Armstrong R, Wen W, Meinkoth J, Taylor S & Montminy M (1995) A refractory phase in cyclic AMP-responsive transcription requires down regulation of protein kinase a. *Mol Cell Biol* 15:1826–1832.

Aton SJ, Colwell CS, Harmor AJ, Waschek J & Herzog ED (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8:476–483.

# B

Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM & Weaver DR (2001) Differential functions of mPER1, mPER2, and mPER3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525–536.

Bae K & Weaver DR (2003) Light-induced phase shifts in mice lacking *mper1* or *mper2*. *J Biol Rhythms* 18:123–133.

Baker JG, Hall IP & Hill SJ (2004) Temporal characteristics of cAMP response element-mediated gene transcription: requirement for sustained cAMP production. *Mol Pharmacol* 65:986–998.

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

Baler R, Covington S & Klein DC (1999) Rat *arylalkylamine N-acetyltransferase* gene: upstream and intronic components of a bipartite promoter. *Biol Cell* 91:699–705.

Baler R & Klein DC (1995) Circadian expression of transcription factor *fra-2* in the rat pineal gland. *J Biol Chem* 270:27319–27325.

Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309:193–199.

Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G & Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344–2347.

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

Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL & Goldman BD (1993) The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 15:161–190.

Becquet D, Girardet C, Guillaumond F, François-Bellan AM & Bosler O (2008) Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56:294–305.

Benyassi A, Schwartz C, Coon SL, Klein DC & Falcon J (2000) Melatonin synthesis: arylalkylamine N-acetyltransferases in trout retina and pineal organ are different. *Neuroreport* 11:255–258.

Benyassi A, Schwartz C, Ducouret B & Falcon J (2001) Glucocorticoid receptors and serotonin N-acetyltransferase activity in the fish pineal organ. *Neuroreport* 12:889–892.

Berg GR & Klein DC (1971) Pineal gland in organ culture. II. role of adenosine 3',5'-monophosphate in the regulation of radiolabeled melatonin production. *Endocrinology* 89:453–464.

Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12:142–148.

Berkowitz LA & Gilman MZ (1990) Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5258–5262.

Berlin I, Touitou Y, Guillemant S, Danjou P & Puech AJ (1995) Beta-adrenoceptor agonists do not stimulate daytime melatonin secretion in healthy subjects. a double blind placebo controlled study. *Life Sci* 56:photopériode longue325–photopériode longue331.

Bernard M, Donohue SJ & Klein DC (1995) Human hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal gland, retina and y79 retinoblastoma cells. *Brain Res* 696:37–48.

Bernard M, Voisin P & Klein DC (1996) Hydroxyindole-O-methyltransferase in y-79 cells: regulation by serum. *Brain Res* 727:118–124.

Besaçon R, Chouaf L, Jouvét A, Sliwinski S, Belin MF & Fèvre-Montange M (1995) Developmental expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 29:253–262.

Besaçon R, Simonneaux V, Jouvét A, Belin MF & Fèvre-Montange M (1996) Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 40:136–138.

Bittman EL, Crandell RG & Lehman MN (1989) Influences of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and olfactory bulbs on melatonin responses in the golden hamster. *Biol Reprod* 40:118–126.

Bittman EL & Karsch FJ (1984) Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod* 30:585–593.

Borjigin J, Wang MM & Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378:783–785.

Bowers CW & Zigmond RE (1980) Electrical stimulation of the cervical sympathetic trunks mimics the effects of darkness on the activity of serotonin N-acetyltransferase in the rat pineal. *Brain Res* 185:435–440.

Brainard GC, Petterborg LJ, Richardson BA & Reiter RJ (1982) Pineal melatonin in syrian hamsters: circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* 35:342–348.

Buda M & Klein DC (1978) A suspension culture of pinealocytes: regulation of N-acetyltransferase activity. *Endocrinology* 103:1483–1493.

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

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

Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS & Bradfield CA (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103:1009–1017.

Burkart AD, Mukherjee A & Mayo KE (2006) Mechanism of repression of the inhibin alpha-subunit gene by inducible 3',5'-cyclic adenosine monophosphate early repressor. *Mol Endocrinol* 20:584–597.

Burke Z, Wells T, Carter D, Klein D & Baler R (1999) Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem* 73:1343–1349.

## C

Cailotto C, Fleur SEL, Heijningen CV, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M, Pévet P & Buijs RM (2005) The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci* 22:2531–2540.

Cardinali DP, Gejman PV & Ritta MN (1983) Further evidence of adrenergic control of translocation and intracellular levels of estrogen receptors in rat pineal gland. *Endocrinology* 112:492–498.

Cardinali DP & Rosner JM (1971) Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology* 89:301–303.

Cardinali DP & Wurtman RJ (1972) Hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and harderian gland. *Endocrinology* 91:247–252.

Carter DA (1990) Temporally defined induction of *c-fos* in the rat pineal. *Biochem Biophys Res Commun* 166:589–594.

Carter DA (1992) Neurotransmitter-stimulated immediate-early gene responses are organized through differential post-synaptic receptor mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res* 16:111–118.

Carter DA (1993) Differential intracellular mechanisms mediate the co-ordinate induction of *c-fos* and *jun-b* in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol* 244:285–291.

Carter DA (1993) Noradrenergic regulation of *c-jun* expression in the rat pineal gland in culture: positive and negative components. *Eur J Pharmacol* 247:97–100.

- Carter DA (1993) Up-regulation of beta 1-adrenoceptor messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland: nocturnally, through a beta-adrenoceptor-linked mechanism, and in vitro, through a novel posttranscriptional mechanism activated by specific protein synthesis inhibitors. *Endocrinology* 133:2263–2268.
- Carter DA (1994) A daily rhythm of Activator Protein-1 activity in the rat pineal is dependent upon trans-synaptic induction of *junb*. *Neuroscience* 62:1267–1278.
- Carter DA (1997) Rhythms of cellular immediate-early gene expression: more than just an early response. *Exp Physiol* 82:237–244.
- Ceña V, Halperin JJ, Yeandle S & Klein DC (1991) Norepinephrine stimulates potassium efflux from pinealocytes: evidence for involvement of biochemical "and" gate operated by calcium and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 128:559–569.
- Cechetto DF & Saper CB (1988) Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272:579–604.
- Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A & Sassone-Corsi P (2001) Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *period1* gene. *EMBO J* 20:3967–3974.
- Cesare DD, Vallone D, Caracciolo A, Sassone-Corsi P, Nerlov C & Verde P (1995) Heterodimerization of c-JUN with ATF-2 and c-FOS is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene* 11:365–376.
- Challet E & Pévet P (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci* 8:s246–s257.
- Champney TH, Steger RW, Christie DS & Reiter RJ (1985) Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and syrian hamster. *Brain Res* 338:25–32.
- Chan A & Ebadi M (1980) The kinetics of norepinephrine-induced stimulation of serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* 31:244–251.
- Chan A & Ebadi M (1981) Effects of norepinephrine on pineal tryptophan hydroxylase, using an improved [<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub>-trapping microtechnique. *J Pharmacol Methods* 6:13–20.
- Chan GC, Lernmark U, Xia Z & Storm DR (2001) DNA elements of the type 1 adenylyl cyclase gene locus enhance reporter gene expression in neurons and pinealocytes. *Eur J Neurosci* 13:2054–2066.
- Chansard M, Iwahana E, Liang J & Fukuhara C (2005) Regulation of cAMP-induced *Arylalkylamine N-acetyltransferase*, *period1*, and *mkp-1* gene expression by mitogen-activated protein kinases in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 139:333–340.
- Chansard M, Liang J, Iwahana E, Baker T, Whittaker J & Fukuhara C (2006) Role of calcium in the gating of isoproterenol-induced *arylalkylamine N-acetyltransferase* gene expression in the mouse pineal gland. *J Pineal Res* 41:85–94.
- Chen W & Baler R (2000) The rat *arylalkylamine N-acetyltransferase* E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res* 81:43–50.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM & Zhou QY (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417:405–410.
- Chetsawang B, Govitrapong P & Møller M (2001) The effects of adrenergic agonists on c-FOS, JUN-B and Nitric Oxide Synthase-like immunoreactivities in cultured rat pinealocytes. *J Pineal Res* 31:186–192.
- Cheung PW & McCormack CE (1982) Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. *Am J Physiol* 242:R261–R264.
- Chik CL, Arnason TG, Dukewich WG, Price DM, Ranger A & Ho AK (2007) Histone H3 phosphorylation in the rat pineal gland: adrenergic regulation and diurnal variation. *Endocrinology* 148:1465–1472.
- Chik CL & Ho AK (1989) Multiple receptor regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 53:197–203.
- Chik CL, Liu QY, Li B, Karpinski E & Ho AK (1995) cGMP inhibits l-type Ca<sup>2+</sup> channel currents through protein phosphorylation in rat pinealocytes. *J Neurosci* 15:3104–3109.
- Chik CL, Mackova M, Price D & Ho AK (2004) Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology* 145:5194–5201.
- (Chik *et al.*, 1991)
- Chik CL, Young I & Ho AK (1991) Differential involvement of the arachidonic acid cascade on the alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide-versus beta-adrenergic-stimulated cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in rat pinealocytes. *J Neurochem* 57:1534–1539.
- Chinenov Y & Kerppola TK (2001) Close encounters of many kinds: FOS-JUN interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20:2438–2452.
- Choi BH, Chae HD, Park TJ, Oh J, Lim J, Kang SS, Ha H & Kim KT (2004) Protein kinase C regulates the activity and stability of serotonin N-acetyltransferase. *J Neurochem* 90:442–454.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR & Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855–859.
- Chuluyan HE, Rosenstein RE, Chang SM, Gálvez MM & Cardinali DP (1991) Presynaptic effects of melatonin on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *J Pineal Res* 10:165–173.
- Clayton AL, Hazzalin CA & Mahadevan LC (2006) Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell* 23:289–296.
- Colwell CS, Ralph MR & Menaker M (1990) Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Res* 523:117–120.

- Coon SL & Klein DC (2006) Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol Cell Endocrinol* 252:2–10.
- Coon SL, Mazuruk K, Bernard M, Roseboom PH, Klein DC & Rodriguez IR (1996) The human *serotonin N-acetyltransferase* (ec 2.3.1.87) gene (*Aanat*): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34:76–84.
- Coon SL, McCune SK, Sugden D & Klein DC (1997) Regulation of pineal alpha1b-adrenergic receptor mRNA: day/night rhythm and beta-adrenergic receptor/cyclic AMP control. *Mol Pharmacol* 51:551–557.
- Coon SL, Olmo ED, Young WS & Klein DC (2002) Melatonin synthesis enzymes in *macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (ec 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 87:4699–4706.
- Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin EV & Klein DC (1995) Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681–1683.
- Cowen PJ, Bevan JS, Gosden B & Elliott SA (1985) Treatment with beta-adrenoceptor blockers reduces plasma melatonin concentration. *Br J Clin Pharmacol* 19:258–260.
- Craft CM, Morgan WW, Jones DJ & Reiter RJ (1985) Hamster and rat pineal gland beta-adrenoceptor characterization with iodocyanopindolol and the effect of decreased catecholamine synthesis on the receptor. *J Pineal Res* 2:51–66.
- Craft CM, Morgan WW & Reiter RJ (1984) 24-hour changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands. *Neuroendocrinology* 38:193–198.
- Craft CM, Murage J, Brown B & Zhan-Poe X (1999) Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Brain Res Mol Brain Res* 65:44–51.
- Côté F, Schussler N, Boularand S, Peirottes A, Thévenot E, Mallet J & Vodjdani G (2002) Involvement of NFY and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the *tryptophan hydroxylase (tph)* gene in the pineal gland. *J Neurochem* 81:673–685.
- Cutler DJ, Haraura M, Reed HE, Shen S, Sheward WJ, Morrison CF, Marston HM, Harmar AJ & Piggins HD (2003) The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *Eur J Neurosci* 17:197–204.
- Dardente H (2007) Does a melatonin-dependent circadian oscillator in the *Pars Tuberalis* drive prolactin seasonal rhythmicity? *J Neuroendocrinol* 19:657–666.
- Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosen P, Pévet P & Masson-Pévet M (2003) Melatonin induces *cry1* expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 114:101–106.
- Davies JS & Carter DA (2006) Protein/DNA interaction profiling reveals novel regulators of the pineal transcriptome. *Mol Cell Endocrinol* 252:19–26.
- Deguchi T (1973) Role of the beta adrenergic receptor in the elevation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and induction of serotonin N-acetyltransferase in rat pineal glands. *Mol Pharmacol* 9:184–190.
- Deguchi T & Axelrod J (1972) Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2547–2550.
- Deguchi T & Axelrod J (1972) Induction and superinduction of serotonin N-acetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in rat pineal organ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2208–2211.
- Deguchi T & Axelrod J (1973) Superinduction of serotonin N-acetyltransferase and supersensitivity of adenylyl cyclase to catecholamines in denervated pineal gland. *Mol Pharmacol* 9:612–618.
- Deguchi T & Barchas J (1972) Effect of p-chlorophenylalanine on hydroxylation of tryptophan in pineal and brain of rats. *Mol Pharmacol* 8:770–779.
- Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, de Groot RP, Foulkes NS & Sassone-Corsi P (1992) Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4226–4230.
- Deng T & Karin M (1993) JUN-B differs from c-JUN in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-JUN by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 7:479–490.
- Diaz E, Garidou ML, Dardente H, Salingre A, Pévet P & Simonneaux V (2003) Expression and regulation of *Icer* mRNA in the syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 112:163–169.
- Dickinson KE, Leeb-Lundberg LM, Strasser RH, Caron MG & Lefkowitz RJ (1986) Identification of the subunit structure of rat pineal adrenergic receptors by photoaffinity labeling. *J Neurochem* 46:1153–1160.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA & Gillette MU (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and no. *Science* 266:1713–1717.
- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR & Gillette MU (1997) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* 17:667–675.
- Djeridane Y, Pitrosky B, Vivien-Roels B, Simonneaux V, Kirsch R & Pévet P (2000) Long-term daily melatonin infusion induces a large increase in N-acetyltransferase

## D

Daan S, Albrecht U, van der Horst GT, Illnerová H, Roenneberg T, Wehr TA & Schwartz WJ (2001) Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? *J Biol Rhythms* 16:105–116.

activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin content in the harderian gland and eye of pinealectomized male siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Pineal Res* 29:65–73.

Doi M, Hirayama J & Sassone-Corsi P (2006) Circadian regulator clock is a histone acetyltransferase. *Cell* 125:497–508.

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

Drijfhout WJ, van der Linde AG, Kooi SE, Grol CJ & Westerink BH (1996) Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 66:748–755.

## E

Eggers A, Siemann G, Blume R & Knepel W (1998) Gene-specific transcriptional activity of the insulin cAMP-responsive element is conferred by NF-Y in combination with cAMP response element-binding protein. *J Biol Chem* 273:18499–18508.

Ehret M, Cash CD, Hamon M & Maitre M (1989) Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem* 52:1886–1891.

Ehret M, Pevet P & Maitre M (1991) Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem* 57:1516–1521.

Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA & Virshup DM (2002) The circadian regulatory proteins BMAL1 and Cryptochromes are substrates of Casein Kinase I epsilon. *J Biol Chem* 277:17248–17254.

Engel L, Gupta BBP, Lorenzkowski V, Heinrich B, Schwerdtle I, Gerhold S, Holthues H, Vollrath L & Spessert R (2005) FOS-related antigen 2 (fra-2) memorizes photoperiod in the rat pineal gland. *Neuroscience* 132:511–518.

Engel L, Mathes A, Schwerdtle I, Heinrich B, Pogorzelski B, Holthues H, Vollrath L & Spessert R (2004) Rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase: cyclic AMP inducibility of its gene depends on prior entrained photoperiod. *Brain Res Mol Brain Res* 123:45–55.

Engel L, Mathes A, Schwerdtle I, Heinrich B, Pogorzelski B, Holthues H, Vollrath L & Spessert R (2004) Rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase: cyclic AMP inducibility of its gene depends on prior entrained photoperiod. *Brain Res Mol Brain Res* 123:45–55.

## F

Falcón J (1999) Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol* 58:121–162.

Falcón J, Gothilf Y, Coon SL, Boeuf G & Klein DC (2003) Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J Neuroendocrinol* 15:378–382.

Faniello MC, Bevilacqua MA, Condorelli G, de Crombrughe B, Maity SN, Avvedimento VE, Cimino F & Costanzo F (1999) The b subunit of the CAAT-binding factor nfy binds the central segment of the co-activator p300. *J Biol Chem* 274:7623–7626.

Fass DM, Butler JEF & Goodman RH (2003) Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *J Biol Chem* 278:43014–43019.

Ferreira ZS, Fernandes PACM, Duma D, Assreuy J, Avellar MCW & Markus RP (2005) Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa b. *J Pineal Res* 38:182–188.

Field MD, Maywood ES, O'Brien JA, Weaver DR, Reppert SM & Hastings MH (2000) Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* 25:437–447.

Fink-Jensen A & Møller M (1990) Direct projections from the anterior and tuberal regions of the lateral hypothalamus to the rostral part of the pineal complex of the rat. an anterograde neuron-tracing study by using phaseolus vulgaris leucoagglutamatetinin. *Brain Res* 522:337–341.

Fleming JV, Barrett P, Coon SL, Klein DC & Morgan PJ (1999) Ovine arylalkylamine N-acetyltransferase in the pineal and pituitary glands: differences in function and regulation. *Endocrinology* 140:972–978.

Fontana JA & Lovenberg W (1971) A cyclic AMP-dependent protein kinase of the bovine pineal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2787–2790.

Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH & Sassone-Corsi P (1996) Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14140–14145.

Foulkes NS, Borrelli E & Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64:739–749.

Foulkes NS, Duval G & Sassone-Corsi P (1996) Adaptive inducibility of CREM as transcriptional memory of circadian rhythms. *Nature* 381:83–85.

Foulkes NS, Laoide BM, Schlotter F & Sassone-Corsi P (1991) Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates *c-fos* cAMP-induced expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5448–5452.

Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z & Foster R (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284:502–504.

Freire F & Cardinali DP (1975) Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. *J Neural Transm* 37:237–257.

Fukuhara C, Dirden JC & Tosini G (2000) Circadian expression of *period 1*, *period 2*, and *arylalkylamine N-acetyltransferase* mRNA in the rat pineal gland under different light conditions. *Neurosci Lett* 286:167–170.

Fukuhara C, Dirden JC & Tosini G (2002) Regulation of *period 1* expression in cultured rat pineal. *Neurosignals* 11:103–114.

Fukuhara C, Dirden JC & Tosini G (2003) Analysis of gene expression following norepinephrine stimulation in the rat pineal gland using DNA microarray technique. *J Pineal Res* 35:196–203.

Fukuhara C, Liu C, Ivanova TN, Chan GCK, Storm DR, Iuvone PM & Tosini G (2004) Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J Neurosci* 24:1803–1811.

Fukuhara C, Yamazaki S & Liang J (2005) Pineal circadian clocks gate *arylalkylamine N-acetyltransferase* gene expression in the mouse pineal gland. *J Neurochem* 93:156–162.

Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC & Cepko CL (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *crx*-deficient mice. *Nat Genet* 23:466–470.

Furukawa Y, Ikuta N, Omata S, Yamauchi T, Isobe T & Ichimura T (1993) Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 194:144–149.

## G

Ganguly S, Coon SL & Klein DC (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 309:127–137.

Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Nambodiri MA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA & Klein DC (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8083–8088.

Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B & Klein DC (2005) Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1222–1227.

Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pévet P & Simonneaux V (2001) In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience* 105:721–729.

Garidou ML, Diaz E, Calgari C, Pévet P & Simonneaux V (2003) Transcription factors may frame *Aa-nat* gene expression and melatonin synthesis at night in the syrian hamster pineal gland. *Endocrinology* 144:2461–2472.

Garidou ML, Gauer F, Vivien-Roels B, Sicard B, Pévet P & Simonneaux V (2002) Pineal *arylalkylamine N-acetyltransferase* gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent, *arvicanthis ansorgei*. *Eur J Neurosci* 15:1632–1640.

Garidou ML, Ribelayga C, Pévet P & Simonneaux V (2002) Syrian hamster and rat display developmental differences in the regulation of pineal *arylalkylamine N-acetyltransferase*. *J Neuroendocrinol* 14:861–868.

Garidou ML, Vivien-Roels B, Pévet P, Miguez J & Simonneaux V (2003) Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the european hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1043–R1052.

Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL & Klein DC (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358–1360.

Gaston S & Menaker M (1967) Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158:925–928.

Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Minh NL, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW & Schützer G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34:245–253.

Gauer F & Craft CM (1996) Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res* 737:99–109.

Gauer F, Poirel VJ, Garidou ML, Simonneaux V & Pévet P (1999) Molecular cloning of the *arylalkylamine-N-acetyltransferase* and daily variations of its mRNA expression in the syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 71:87–95.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS & Weitz CJ (1998) Role of the clock protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564–1569.

Ghosh S, Wu Y, Li R & Hu Y (2005) JUN proteins modulate the ovary-specific promoter of aromatase gene in ovarian granulosa cells via a cAMP-responsive element. *Oncogene* 24:2236–2246.

Gillette MU & Mitchell JW (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res* 309:99–107.

Goldman BD (1999) The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids* 64:679–685.

Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16:283–301.

Goldman PS, Tran VK & Goodman RH (1997) The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res* 52:103–19; discussion 119–20.

Gonzalez GA & Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell* 59:675–680.

Gonzalez-Brito A, Jones DJ, Adame RM & Reiter RJ (1988) Characterization and measurement of [<sup>125</sup>I]iodopindolol binding in individual rat pineal glands: existence of a 24-h rhythm in beta-adrenergic receptor density. *Brain Res* 438:108–114.

Gonzalez-Brito A, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Guerrero JM, Santana C & Jones DJ (1988) Darkness-induced changes in noradrenergic input determine the 24 hour variation in beta-adrenergic receptor density in the rat pineal gland: in vivo physiological and pharmacological evidence. *Life Sci* 43:707–714.

Gonzalez-Brito A, Reiter RJ, Santana C, Menendez-Pelaez A & Guerrero JM (1988) Beta-adrenergic stimulation prior to darkness advances the nocturnal increase of syrian hamster pineal melatonin synthesis. *Brain Res* 475:393–396.

Gonzalez-Brito A, Reiter RJ, Tannenbaum MG & Jones DJ (1988) Adrenalectomy but not gonadectomy affects rat pineal beta-adrenergic receptor density. *Neurosci Lett* 92:330–334.

Gonzalez-Brito A, Troiani ME, Menendez-Pelaez A, Delgado MJ & Reiter RJ (1990) mRNA transcription determines the lag period for the induction of pineal melatonin synthesis in the syrian hamster pineal gland. *J Cell Biochem* 44:55–60.

Guillaumond F, Sage D, Deprez P, Bosler O, Becquet D & François-Bellan AM (2000) Circadian binding activity of AP-1, a regulator of the arylalkylamine N-acetyltransferase gene in the rat pineal gland, depends on circadian fra-2, c-jun, and jun-d expression and is regulated by the clock's zeitgebers. *J Neurochem* 75:1398–1407.

Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RBS & Bittman EL (2005) Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3111–3116.

## H

Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R & Montminy MR (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13:4852–4859.

Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME & Leder P (1988) c-JUN dimerizes with itself and with c-FOS, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55:917–924.

Hall RA (2004) Beta-adrenergic receptors and their interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15:281–288.

Hamada T, Ootomi M, Horikawa K, Niki T, Wakamatu H & Ishida N (1999) The expression of the melatonin synthesis enzyme: arylalkylamine N-acetyltransferase in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 258:772–777.

Han S, Kim TD, Ha DC & Kim KT (2005) Rhythmic expression of adenylyl cyclase VI contributes to the differential regulation of serotonin N-acetyltransferase by bradykinin in rat pineal glands. *J Biol Chem* 280:38228–38234.

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

Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, Sheward WJ, Morrison CF, Dorin JR, Piggins HD, Reubi JC, Kelly JS, Maywood ES & Hastings MH (2002) The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109:497–508.

Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG & Yau KW (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424:76–81.

Hayashi K & Okatani Y (1999) Mechanisms underlying the effects of estrogen on nocturnal melatonin synthesis in peripubertal female rats: relation to norepinephrine and adenylyl cyclase. *J Pineal Res* 26:178–183.

Hayashi M, Haga M, Yatsushiro S, Yamamoto A & Moriyama Y (1999) Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* 73:2538–2545.

Hazlerigg DG, Ebling FJP & Johnston JD (2005) Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr Biol* 15:R449–R450.

Hazlerigg DG, Hastings MH & Morgan PJ (1996) Production of a prolactin releasing factor by the ovine *Pars Tuberalis*. *J Neuroendocrinol* 8:489–492.

Herdegen T & Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by JUN, FOS and KROX, and CREB/ataf proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28:370–490.

Hernandez G, Abreu P, Alonso R, Santana C, Moujir F & Calzadilla C (1990) Castration reduces the nocturnal rise of pineal melatonin levels in the male rat by impairing its noradrenergic input. *J Neuroendocrinol* 2:777–782.

Hernandez-Diaz FJ, Sánchez JJ, Abreu P, Lopez-Coviella I, Tabares L, Prieto L & Alonso R (2001) Estrogen modulates alpha(1)/beta-adrenoceptor-induced signaling and melatonin production in female rat pinealocytes. *Neuroendocrinology* 73:111–122.

Herzog ED, Takahashi JS & Block GD (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci* 1:708–713.

Hess J, Angel P & Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117:5965–5973.

- Hickman AB, Klein DC & Dyda F (1999) Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. *Mol Cell* 3:23–32.
- Hickman AB, Namboodiri MA, Klein DC & Dyda F (1999) The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog. *Cell* 97:361–369.
- Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R & Yaniv M (1989) Characterization of JUN-D: a new member of the JUN proto-oncogene family. *EMBO J* 8:1433–1439.
- Ho AK & Chik CL (1992) Inhibitors of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange block stimulus-provoked pineal melatonin synthesis. *Am J Physiol* 263:E481–E488.
- Ho AK & Chik CL (2000) Adrenergic regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase in rat pinealocytes: opposing effects of protein kinase A and protein kinase G. *Endocrinology* 141:4496–4502.
- Ho AK, Chik CL & Klein DC (1987) Protein kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation. *J Biol Chem* 262:10059–10064.
- Ho AK, Chik CL & Klein DC (1988) Effects of protein kinase inhibitor (1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (h7) on protein kinase C activity and adrenergic stimulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *Biochem Pharmacol* 37:1015–1020.
- Ho AK, Chik CL & Klein DC (1988) Permissive role of calcium in alpha 1-adrenergic stimulation of pineal phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C) activity. *J Pineal Res* 5:553–564.
- Ho AK, Chik CL, Weller JL, Cragoe EJ & Klein DC (1989) Evidence of alpha 1-adrenergic-protein kinase c-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter-dependent increase in pinealocyte intracellular pH. Role in the adrenergic stimulation of cGMP accumulation. *J Biol Chem* 264:12983–12988.
- Ho AK & Klein DC (1987) Activation of alpha 1-adrenoceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca<sup>2+</sup> elevating agents increases pineal phospholipase A2 activity. Evidence that protein kinase C may participate in Ca<sup>2+</sup>-dependent alpha 1-adrenergic stimulation of pineal phospholipase A2 activity. *J Biol Chem* 262:11764–11770.
- Ho AK & Klein DC (1987) Phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C) activity in the pineal gland: characterization and photoneural regulation. *J Neurochem* 48:1033–1038.
- Ho AK, Mackova M, Cho C & Chik CL (2003) Regulation of 90-kilodalton ribosomal S6 kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology* 144:3344–3350.
- Ho AK, Mackova M, Price L & Chik CL (2003) Diurnal variation in p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol* 208:23–30.
- Ho AK, Ogiwara T & Chik CL (1996) Thapsigargin modulates agonist-stimulated cyclic AMP responses through cytosolic calcium-dependent and -independent mechanisms in rat pinealocytes. *Mol Pharmacol* 49:1104–1112.
- Ho AK, Price DM, Dukewich WG, Steinberg N, Arnason TG & Chik CL (2007) Acetylation of histone H3 and adrenergic-regulated gene transcription in rat pinealocytes. *Endocrinology* 148:4592–4600.
- Ho AK, Price DM, Terriff D & Chik CL (2006) Timing of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol* 252:34–39.
- Ho AK, Terriff DL, Price DM, Wloka MT & Chik CL (2007) The role of inducible repressor proteins in the adrenergic induction of arylalkylamine-N-acetyltransferase and Mitogen-Activated Protein Kinase phosphatase-1 in rat pinealocytes. *Endocrinology* 148:743–751.
- Ho AK, Thomas TP, Chik CL, Anderson WB & Klein DC (1988) Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca<sup>2+</sup> influx. Evidence that Ca<sup>2+</sup>-dependent subcellular redistribution of protein kinase C is involved in potentiation of beta-adrenergic stimulation of pineal cAMP and cGMP by K<sup>+</sup> and a23187. *J Biol Chem* 263:9292–9297.
- Ho AK, Young I & Chik CL (1991) Evidence for a role of calmodulin in regulation of pinealocyte cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 41:897–903.
- Hoeffler JP, Deutsch PJ, Lin J & Habener JF (1989) Distinct adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol ester-responsive signal transduction pathways converge at the level of transcriptional activation by the interactions of DNA-binding proteins. *Mol Endocrinol* 3:868–880.
- Hoeffler JP & Habener JF (1990) Characterization of a cyclic AMP regulatory element DNA-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* 1:155–158.
- Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S & Bradfield CA (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5474–5479.
- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K & Nomura M (1998) Circadian oscillation of *bmal1*, a partner of a mammalian clock gene *clock*, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 250:83–87.
- Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M & Honma K (1998) Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci Lett* 250:157–160.
- Honma S, Shirakawa T, Nakamura W & Honma K (2000) Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neurosci Lett* 294:113–116.
- Humphries A, Klein D, Baler R & Carter DA (2002) cDNA array analysis of pineal gene expression reveals circadian rhythmicity of the dominant negative helix-loop-helix protein-encoding gene, *id-1*. *J Neuroendocrinol* 14:101–108.
- Humphries A, Wells T, Baler R, Klein DC & Carter DA (2007) Rodent *Aanat*: intronic E-box sequences control tissue specificity but not rhythmic expression in the pineal gland. *Mol Cell Endocrinol* 270:43–49.

# I

Illnerová H, Hoffmann K & Vanecek J (1984) Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 38:226–231.

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

Illnerová H & Vanecek J (1983) The evening rise in the rat pineal N-acetyltransferase activity under various photoperiods. *Neurosci Lett* 36:279–284.

Illnerová H, Vanecek J, Krecek J, Wetterberg L & Sääf J (1979) Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. *J Neurochem* 32:673–675.

Inouye ST & Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5962–5966.

Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G & Okamura H (2005) Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glutamatecorticoid release. *Cell Metab* 2:297–307.

Ivashkiv LB, Liou HC, Kara CJ, Lamph WW, Verma IM & Glimcher LH (1990) MXBP/CRE-BP2 and c-JUN form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element. *Mol Cell Biol* 10:1609–1621.

# J

Jagota A, de la Iglesia HO & Schwartz WJ (2000) Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat Neurosci* 3:372–376.

Jác M, Kiss A, Sumová A, Illnerová H & Jezová 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.

Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ & Reppert SM (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96:57–68.

Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM & Weaver DR (2003) Targeted disruption of the mouse MEL(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23:1054–1060.

Johnson LY, Vaughan MK, Richardson BA, Petterborg LJ & Reiter RJ (1982) Variation in pineal melatonin content during the estrous cycle of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 169:416–419.

Johnston JD (2005) Measuring seasonal time within the circadian system: regulation of the suprachiasmatic nuclei by photoperiod. *J Neuroendocrinol* 17:459–465.

Johnston JD, Ebling FJP & Hazlerigg DG (2005) Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* 21:2967–2974.

# K

Kalsbeek A, Buijs RM, van Heerikhuizen JJ, Arts M & van der Woude TP (1992) Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res* 580:62–67.

Kalsbeek A, Cutrera RA, Heerikhuizen JJV, Vliet JVD & Buijs RM (1999) GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 91:453–461.

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

Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Vliet JVD, Simonneaux V, Pévet P & Buijs RM (2000) Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 12:3146–3154.

Kalsbeek A, Palm IF & Buijs RM (2002) Central vasopressin systems and steroid hormones. *Prog Brain Res* 139:57–73.

Kalsbeek A, Palm IF, Fleur SEL, Scheer FAJL, Perreault-Lenz S, Ruiters M, Kreier F, Cailotto C & Buijs RM (2006) SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 21:458–469.

Kalsbeek A, Rijkers M, Vivien-Roels B & Pévet P (1993) Vasopressin and vasoactive intestinal peptide infused in the paraventricular nucleus of the hypothalamus elevate plasma melatonin levels. *J Pineal Res* 15:46–52.

Kalsbeek A, van der Vliet J & Buijs RM (1996) Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol* 8:299–307.

Karasek M & Reiter RJ (1992) Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech* 21:136–157.

Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by Mitogen-Activated Protein Kinases. *J Biol Chem* 270:16483–16486.

Karolczak M, Burbach GJ, Sties G, Korf HW & Stehle JH (2004) Clock gene mRNA and protein rhythms in the pineal gland of mice. *Eur J Neurosci* 19:3382–3388.

- Kasa P, Dobo E & Wolff JR (1991) Are there cholinergic through-fibers in the superior cervical ganglion of the mouse? *Histochemistry* 96:261–263.
- Kee BL, Arias J & Montminy MR (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271:2373–2375.
- Kim JS, Bailey MJ, Ho AK, Møller M, Gaildrat P & Klein DC (2007) Daily rhythm in pineal phosphodiesterase (PDE) activity reflects adrenergic/3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate induction of the PDE4b2 variant. *Endocrinology* 148:1475–1485.
- Kim JS, Coon SL, Blackshaw S, Cepko CL, Møller M, Mukda S, Zhao WQ, Charlton CG & Klein DC (2005) Methionine adenosyltransferase:adrenergic-cAMP mechanism regulates a daily rhythm in pineal expression. *J Biol Chem* 280:677–684.
- Kim TD, Kim JS, Kim JH, Myung J, Chae HD, Woo KC, Jang SK, Koh DS & Kim KT (2005) Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. *Mol Cell Biol* 25:3232–3246.
- Kim TK, Kim TH & Maniatis T (1998) Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon-beta enhanceosome in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12191–12196.
- King DP, Vitaterna MH, Chang AM, Dove WF, Pinto LH, Turek FW & Takahashi JS (1997) The mouse clock mutation behaves as an antimorph and maps within the w19h deletion, distal of kit. *Genetics* 146:1049–1060.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey photopériode longue, Turek FW & Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89:641–653.
- Klein D, Auerbach D, Namboodiri M & Weller G (1981) Indole metabolism in the mammalian pineal gland in R Reiter, editor, *The pineal gland* vol. 1 chap. 8 CRC Press, Boca-Raton, FL 199–227.
- Klein DC (2007) Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the timezyme". *J Biol Chem* 282:4233–4237.
- Klein DC, Auerbach DA & Weller JL (1981) Seesaw signal processing in pineal cells: homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4625–4629.
- Klein DC & Berg GR (1970) Pineal gland: stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Psychopharmacol* 3:241–263.
- Klein DC, Berg GR & Weller J (1970) Melatonin synthesis: adenosine 3',5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. *Science* 168:979–980.
- Klein DC, Berg GR, Weller J & Glinsmann W (1970) Pineal gland: dibutyl cyclic adenosine monophosphate stimulation of labeled melatonin production. *Science* 167:1738–1740.
- Klein DC, Buda MJ, Kapoor CL & Krishna G (1978) Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science* 199:309–311.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM & Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52:307–57; discussion 357–8.
- Klein DC, Ganguly S, Coon S, Weller JL, Obsil T, Hickman A & Dyda F (2002) 14-3-3 proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans* 30:365–373.
- Klein DC & Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase : control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174:245–262.
- Klein DC, Namboodiri MA & Auerbach DA (1981) The melatonin rhythm generating system: developmental aspects. *Life Sci* 28:1975–1986.
- Klein DC, Sugden D & Weller JL (1983) Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:599–603.
- Klein DC & Weller JL (1970) Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1093–1095.
- Klein DC & Weller JL (1972) Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* 177:532–533.
- Klosen P, Maessen X & van den Bosch de Aguilar P (1993) PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem* 41:455–463.
- Koch M, Mauhin V, Stehle JH, Schomerus C & Korf HW (2003) Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of *Aanat* gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem* 85:170–179.
- Koistinaho J & Yang G (1990) Induction of c-FOS protein-like immunoreactivity in the rat and hamster pineal gland after the onset of darkness. *Histochemistry* 95:73–76.
- Kondratov RV, Kondratova AA, Lee C, Gorbacheva VY, Chernov MV & Antoch MP (2006) Post-translational regulation of circadian transcriptional clock (NPAS2)/BMAL1 complex by cryptochromes. *Cell Cycle* 5:890–895.
- Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC & Weitz CJ (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294:2511–2515.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH & Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the

negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193–205.

## L

Lalli E, Lee JS, Lamas M, Tamai K, Zazopoulos E, Nantel F, Penna L, Foulkes NS & Sassone-Corsi P (1996) The nuclear response to cAMP: role of transcription factor CREM. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:201–209.

Lamas M, Monaco L, Zazopoulos E, Lalli E, Tamai K, Penna L, Mazzucchelli C, Nantel F, Foulkes NS & Sassone-Corsi P (1996) CREM: a master-switch in the transcriptional response to cAMP. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:561–567.

Lamas M & Sassone-Corsi P (1997) The dynamics of the transcriptional response to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate: recurrent inducibility and refractory phase. *Mol Endocrinol* 11:1415–1424.

Lambert CM, Machida KK, Smale L, Nunez AA & Weaver DR (2005) Analysis of the prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Biol Rhythms* 20:206–218.

Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M & Verma IM (1990) Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4320–4324.

Landschulz WH, Johnson PF & McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759–1764.

Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F & Sassone-Corsi P (1993) The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J* 12:1179–1191.

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

Larsen PJ, Enquist LW & Card JP (1998) Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur J Neurosci* 10:128–145.

Larsen PJ, Møller M & Mikkelsen JD (1991) Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: a phaseolus vulgaris-leucoagglutaminetin (PHA-L) tracing study. *J Comp Neurol* 306:462–479.

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

Ledo F, Carrión AM, Link WA, Mellström B & Naranjo JR (2000) Dream- $\alpha$ /CREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory

element-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 20:9120–9126.

Ledo F, Kremer L, Mellström B & Naranjo JR (2002) Ca<sup>2+</sup>-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor dream. *EMBO J* 21:4583–4592.

Ledo F, Link WA, Carrión AM, Echeverria V, Mellström B & Naranjo JR (2000) The DREAM-DRE interaction: key nucleotides and dominant negative mutants. *Biochim Biophys Acta* 1498:162–168.

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

Lee CQ, Yun YD, Hoeffler JP & Habener JF (1990) Cyclic-AMP-responsive transcriptional activation of CREB-327 involves interdependent phosphorylated subdomains. *EMBO J* 9:4455–4465.

Lee SY, Choi BH, Hur EM, Lee JH, Lee SJ, Lee CO & Kim KT (2006) Norepinephrine activates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry coupled to large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat pinealocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1060–C1066.

Lee W, Mitchell P & Tjian R (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49:741–752.

Lee YH, Park JS, Park CH & Lee SK (1998) Synergistic effect of cyclic AMP and insulin on the expression of cyclin A gene in Swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 244:843–848.

Lehman MN, Bittman EL & Newman SW (1984) Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in neuroendocrine responses to daylength in the golden hamster. *Brain Res* 308:25–32.

Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M & Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* 7:1626–1638.

Letz B, Schomerus C, Maronde E, Korf HW & Korbmayer C (1997) Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat pinealocytes. *J Physiol* 499 (Pt 2):329–340.

Lewy AJ, Tetsuo M, Markey SP, Goodwin FK & Kopin IJ (1980) Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 50:204–205.

Li X, Chen S, Wang Q, Zack DJ, Snyder SH & Borjigin J (1998) A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1876–1881.

Lin AM, Schaad NC, Schulz PE, Coon SL & Klein DC (1994) Pineal nitric oxide synthase: characteristics, adrenergic regulation and function. *Brain Res* 651:160–168.

Lincoln G, Messenger S, Andersson H & Hazlerigg D (2002) Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13890–13895.

Lincoln GA, Andersson H & Clarke IJ (2003) Prolactin cycles in sheep under constant photoperiod: evidence that photorefractoriness develops within the pituitary gland independently of the prolactin output signal. *Biol Reprod* 69:1416–1423.

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

Link WA, Ledo F, Torres B, Palczewska M, Madsen TM, Savignac M, Albar JP, Mellström B & Naranjo JR (2004) Day-night changes in downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J Neurosci* 24:5346–5355.

Lipton JS, Petterborg LJ & Reiter RJ (1981) Influence of propranolol, phenoxybenzamine or phentolamine in the in vivo nocturnal rise of pineal melatonin levels in the syrian hamster. *Life Sci* 28:2377–2382.

Lipton JS, Petterborg LJ, Steinlechner S & Reiter RJ (1982) In vivo responses of the pineal gland of the syrian hamster to isoproterenol or norepinephrine. *Prog Clin Biol Res* 92:107–115.

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

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

Liu C, Weaver DR, Strogatz SH & Reppert SM (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91:855–860.

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

Lovenberg W, Jequier E & Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155:217–219.

Lowrey photopériode longue, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M & Takahashi JS (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483–492.

Lucas RJ, Freedman MS, Lupi D, Munoz M, David-Gray ZK & Foster RG (2001) Identifying the photoreceptive inputs to the mammalian circadian system using transgenic and retinally degenerate mice. *Behav Brain Res* 125:97–102.

Lucas RJ, Stirland JA, Darrow JM, Menaker M & Loudon AS (1999) Free running circadian rhythms of melatonin, luteinizing hormone, and cortisol in syrian hamsters bearing the circadian tau mutation. *Endocrinology* 140:758–764.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF & Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.

Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM & Richmond TJ (1997) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol* 272:301–311.

## M

Mackova M, Man JR, Chik CL & Ho AK (2000) p38MAPK inhibition enhances basal and norepinephrine-stimulated p42/44MAPK phosphorylation in rat pinealocytes. *Endocrinology* 141:4202–4208.

Malpoux B, Migaud M, Tricoire H & Chemineau P (2001) Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 16:336–347.

Malpoux B, Thiéry JC & Chemineau P (1999) Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 39:355–366.

Man JR, Rustaeus S, Price DM, Chik CL & Ho AK (2004) Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase adrenergic-stimulated arylalkylamine N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *Endocrinology* 145:1167–1174.

Maronde E, Middendorff R, Telgmann R, Møller D, Hemmings B, Taskén K & Olcese J (1997) Melatonin synthesis in the bovine pineal gland is regulated by type ii cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 68:770–777.

Maronde E, Pfeffer M, Glass Y & Stehle JH (2007) Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res* 43:16–24.

Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf HW & Stehle JH (1999) Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* 19:3326–3336.

Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf HW & Stehle JH (1999) Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* 19:3326–3336.

Maronde E, Schomerus C, Stehle JH & Korf HW (1997) Control of CREB phosphorylation and its role for induction of melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Biol Cell* 89:505–511.

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

Masquillier D & Sassone-Corsi P (1992) Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by JUN. *J Biol Chem* 267:22460–22466.

- Masson-Pévet M, George D, Kalsbeek A, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N & Pévet 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.
- Maywood ES, O'Brien JA & Hastings MH (2003) Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* 15:329–334.
- McManus KJ & Hendzel MJ (2001) CBP, a transcriptional coactivator and acetyltransferase. *Biochem Cell Biol* 79:253–266.
- Mechta-Grigoriou F, Gerald D & Yaniv M (2001) The mammalian JUN proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* 20:2378–2389.
- Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M & Feramisco JR (1993) Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 127-128:179–186.
- Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG & Morgan PJ (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of *per1* and *Icer* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12:2865–2870.
- Messenger S, Ross AW, Barrett P & Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through *per1* and *Icer* gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9938–9943.
- Metz R, Bannister AJ, Sutherland JA, Hagemeyer C, O'Rourke EC, Cook A, Bravo R & Kouzarides T (1994) c-FOS-induced activation of a TATA-box-containing promoter involves direct contact with TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14:6021–6029.
- Meyer TE & Habener JF (1993) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev* 14:269–290.
- Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN & Bittman EL (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140:207–218.
- Meyer-Bernstein EL & Morin LP (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* 16:2097–2111.
- Míguez JM, Recio J, Vivien-Roels B & Pévet P (1996) Diurnal changes in the content of indoleamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the djungarian hamster (*phodopus sungorus*): effect of photoperiod. *J Pineal Res* 21:7–14.
- Míguez JM, Simonneaux V & Pévet P (1995) Evidence for a regulatory role of melatonin on serotonin release and uptake in the pineal gland. *J Neuroendocrinol* 7:949–956.
- Míguez JM, Recio J, Vivien-Roels B & Pévet P (1995) Daily variation in the content of indoleamines, catecholamines and related compounds in the pineal gland of syrian hamsters kept under long and short photoperiods. *J Pineal Res* 19:139–148.
- Míguez JM, Simonneaux V & Pévet P (1997) The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 23:63–71.
- Mikkelsen JD, Hauser F, deLecea L, Sutcliffe JG, Kilduff TS, Calgari C, Pévet P & Simonneaux V (2001) Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *Eur J Neurosci* 14:419–425.
- Mikkelsen JD & Møller M (1990) A direct neural projection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus to the deep pineal gland of the rat, demonstrated with phaseolus vulgaris leucoagglutamin. *Brain Res* 520:342–346.
- Mikkelsen JD, Panula P & Møller M (1992) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat pineal gland: evidence for a histaminergic central innervation. *Brain Res* 597:200–208.
- Minneman KP & Iversen LL (1976) Cholera toxin induces pineal enzymes in culture. *Science* 192:803–805.
- Minneman KP & Iversen LL (1976) Diurnal rhythm in rat pineal cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. *Nature* 260:59–61.
- Mintz EM & Albers HE (1997) Microinjection of NMDA into the SCN region mimics the phase shifting effect of light in hamsters. *Brain Res* 758:245–249.
- Mioduszevska B, Jaworski J & Kaczmarek L (2003) Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system—a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *J Neurochem* 87:1313–1320.
- Misund K, Steigedal TS, Laegreid A & Thommesen L (2007) Inducible cAMP early repressor splice variants ICER i and iigamma both repress transcription of *c-fos* and *chromogranin A*. *J Cell Biochem* 101:1532–1544.
- Møller M & Baeres FMM (2002) The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 309:139–150.
- Møller M & Liu W (1999) Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia. a retrograde in vivo neuronal tracing study. *Reprod Nutr Dev* 39:345–353.
- Møller M, Mikkelsen JD & Martinet L (1990) Innervation of the mouse pineal gland with neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers. an experimental immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 261:477–483.
- Møller M, Rath MF & Klein DC (2006) The perivascular phagocyte of the mouse pineal gland: an antigen-presenting cell. *Chronobiol Int* 23:393–401.
- Moga MM & Moore RY (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389:508–534.
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E & Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75:875–886.
- Moller M, Masson-Pévet M & Pévet P (1998) Annual variations of the NPYergic innervation of the pineal

gland in the european hamster (*Cricetus cricetus*): a quantitative immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 291:423–431.

Moller M, Phansuwan-Pujito P, Morgan KC & Badiu C (1997) Localization and diurnal expression of mRNA encoding the beta1-adrenoceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization study. *Cell Tissue Res* 288:279–284.

Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807–822.

Montminy MR & Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328:175–178.

Montminy MR, Gonzalez GA & Yamamoto KK (1990) Characteristics of the cAMP response unit. *Metabolism* 39:6–12.

Montminy MR, Gonzalez GA & Yamamoto KK (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 13:184–188.

Moore CB, Siopes TD, Steele CT & Underwood H (2002) Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 126:352–358.

Moore RY & Card JP (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol* 344:403–430.

Moore RY & Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201–206.

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

Moore RY & Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150:112–116.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE & Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24:101–146.

Morgan PJ, Davidson GR & Lawson W (1989) Evidence for dual adrenergic receptor regulation of ovine pineal function. *J Pineal Res* 7:175–183.

Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, MacLean A & Barrett P (1996) The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 137:4018–4026.

Morgan PJ, Williams LM, Lawson W & Riddoch G (1988) Stimulation of melatonin synthesis in ovine pineals in vitro. *J Neurochem* 50:75–81.

Mrugala M, Zlomanczuk P, Jagota A & Schwartz WJ (2000) Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R987–R994.

## N

---

Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F & Schibler U (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119:693–705.

Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Parvin JD & Montminy M (1997) Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev* 11:738–747.

Nakane M, Yokoyama E & Deguchi T (1983) Species heterogeneity of pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Neurochem* 40:790–796.

Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M & Honma K (1999) Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, *clock* and *bm11*, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett* 267:69–72.

Narlikar GJ, Fan HY & Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475–487.

New DC, Tsim ST & Wong YH (2003) G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosignals* 12:59–70.

Nichols M, Weih F, Schmid W, DeVack C, Kowenz-Leutz E, Luckow B, Boshart M & Schütz G (1992) Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J* 11:3337–3346.

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

Nowak SJ & Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20:214–220.

## O

---

Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S & Dyda F (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105:257–267.

O'Dea RF & Zatz M (1976) Catecholamine-stimulated cyclic GMP accumulation in the rat pineal: apparent presynaptic site of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3398–3402.

Oehler T & Angel P (1992) A common intermediary factor (p52/54) recognizing "acidic blob"-type domains is required for transcriptional activation by the JUN proteins. *Mol Cell Biol* 12:5508–5515.

Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N & Ishida N (2005) Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res* 12:191–202.

Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JH & van der Horst GT (1999) Photic induction of *mper1* and *mper2* in *cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286:2531–2534.

Olcese J (1991) Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J Neurochem* 57:943–947.

Orphanides G & Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* 108:439–451.

Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, Tian J, Hoffmann MW & Eichele G (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab* 4:163–173.

Ozaki Y, Wurtman RJ, Alonso R & Lynch HJ (1978) Melatonin secretion decreases during the proestrous stage of the rat estrous cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:531–534.

## P

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

Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Gelder RNV & Hogenesch JB (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301:525–527.

Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I & Kay SA (2002) Melanopsin (*opn4*) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298:2213–2216.

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

Pangerl B, Pangerl A & Reiter RJ (1990) Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* 81:17–29.

Panke ES, Rollag MD & Reiter RJ (1979) Pineal melatonin concentrations in the syrian hamster. *Endocrinology* 104:194–197.

Parfitt A, Weller JL & Klein DC (1976) Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. *Neuropharmacology* 15:353–358.

Parfitt A, Weller JL, Klein DC, Sakai KK & Marks BH (1975) Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal

serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol Pharmacol* 11:241–255.

Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C & Montminy MR (1996) Phosphorylation of CREB at ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16:694–703.

Patten SMV, Ng DC, Th'ng JP, Angelos KL, Smith AJ & Walsh DA (1991) Molecular cloning of a rat testis form of the inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5383–5387.

Pavlicek J, Coon SL, Ganguly S, Weller JL, Hassan SA, Sackett DL & Klein DC (2008) Evidence that proline focuses movement of the floppy loop of arylalkylamine N-acetyltransferase (ec 2.3.1.87). *J Biol Chem* .

Pelayo F, Dubocovich ML & Langer SZ (1977) Regulation of noradrenaline release in the rat pineal through a negative feedback mechanism mediated by presynaptic alpha-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 45:317–318.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pévet P & Buijs RM (2003) Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 17:221–228.

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

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Vliet JVD, Pévet P & Buijs RM (2005) In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience* 130:797–803.

Pfeffer M, KÄ¼hn R, Krug L, Korf HW & Stehle JH (1998) Rhythmic variation in beta1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur J Neurosci* 10:2896–2904.

Pfeffer M, Maronde E, Korf HW & Stehle JH (2000) Antisense experiments reveal molecular details on mechanisms of ICER suppressing cAMP-inducible genes in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 29:24–33.

Pfeffer M, Maronde E, Molina CA, Korf HW & Stehle JH (1999) Inducible cyclic AMP early repressor protein in rat pinealocytes: a highly sensitive natural reporter for regulated gene transcription. *Mol Pharmacol* 56:279–289.

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

Pitrosky B, Kirsch R, Vivien-Roels B, Georg-Bentz I, Canguilhem B & Pevet P (1995) The photoperiodic response in syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* 7:889–895.

Pitrosky B & Pévet P (1997) The photoperiodic response in syrian hamsters depends upon a melatonin-driven rhythm of sensitivity to melatonin. *Biol Signals* 6:264–271.

Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M & Gauer F (2003) Contrary to other non-photic cues,

acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 120:745–755.

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

Privat K, Ravault JP, Chesneau D & Fevre-Montange M (1999) Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina. *J Pineal Res* 26:193–203.

Proudfoot NJ, Furger A & Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108:501–512.

Pévet P (1988) The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev* 28:443–458.

Pévet P (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol* 15:422–426.

Pévet P, Balemans MG, Legerstee WC & Vivien-Roels B (1980) Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-o-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and hardierian gland of the golden hamster. *J Neural Transm* 49:229–245.

## Q

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

## R

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

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

Reiter RJ (1987) The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci* 40:2119–2131.

Reiter RJ (1993) Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res* 26:1141–1155.

Reiter RJ (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654–664.

Reiter RJ, Puig-Domingo M, Guerrero JM & Gonzalez-Brito A (1987) Nocturnal increase in the sensitivity of the syrian hamster pineal gland to isoproterenol is darkness dependent. *Proc Soc Exp Biol Med* 185:219–222.

Reiter RJ, Vaughan GM, Oaknin S, Troiani ME, Cozzi B & Li K (1987) Norepinephrine or isoproterenol stimulation of pineal N-acetyltransferase activity and melatonin content in the syrian hamster is restricted to the

second half of the daily dark phase. *Neuroendocrinology* 45:249–256.

Rekasi Z, Sule N, Csernus V & Mess B (1998) Adrenergic and peptidergic control of the regulation of cAMP efflux and melatonin secretion from perfused rat pineal gland. *Endocrine* 9:89–96.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA & Gusella JF (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8734–8738.

Reppert SM, Perlow MJ, Ungerleider LG, Mishkin M, Tamarkin L, Orloff DG, Hoffman HJ & Klein DC (1981) Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the rhesus monkey. *J Neurosci* 1:1414–1425.

Reppert SM & Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647–676.

Reppert SM, Weaver DR & Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177–1185.

Reppert SM, Weaver DR & Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17:100–102.

Reuss S (1999) Trigeminal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech* 46:305–309.

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

Reuss S & Schröder H (1987) Neuropeptide y effects on pineal melatonin synthesis in the rat. *Neurosci Lett* 74:158–162.

Revel FG, Ansel L, Klosen P, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD & Simonneaux V (2007) Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* 8:57–65.

Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD & Simonneaux V (2006) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16:1730–1735.

Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD & Simonneaux V (2006) Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the syrian hamster. *Endocrinology* 147:4680–4687.

Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Simonneaux V & Mikkelsen JD (2008) RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149:902–912.

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

- Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P & Simonneaux V (1999) Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140:1375–1384.
- Ribelayga C, Gauer F, Pévet P & Simonneaux V (1998) Distribution of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA in the rat brain: an in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res* 291:415–421.
- Ribelayga C, Pévet P & Simonneaux V (1997) Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res* 777:247–250.
- Ribelayga C, Pévet P & Simonneaux V (1998) Possible involvement of neuropeptide y in the seasonal control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the pineal gland of the european hamster (*cricketus cricketus*). *Brain Res* 801:137–142.
- Ribelayga C, Pévet P & Simonneaux V (2000) HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1339–R1345.
- Richards EJ & Elgin SCR (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108:489–500.
- Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J & Glazer RI (1997) Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272:21137–21141.
- Rollag MD, Chen HJ, Ferguson BN & Reiter RJ (1979) Pineal melatonin content throughout the hamster estrous cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 162:211–213.
- Romero JA, Zatz M & Axelrod J (1975) Beta-adrenergic stimulation of pineal N-acetyltransferase: adenosine 3':5'-cyclic monophosphate stimulates both RNA and protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2107–2111.
- Ronnekleiv OK & Kelly MJ (1984) Distribution of substance P neurons in the epithalamus of the rat: an immunohistochemical investigation. *J Pineal Res* 1:355–370.
- Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL & Klein DC (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137:3033–3045.
- Roseboom PH & Klein DC (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 47:439–449.
- Rosenstein RE, Chuluyan HE, Diaz MC & Cardinali DP (1990) GABA as a presumptive paracrine signal in the pineal gland. evidence on an intrapineal GABAergic system. *Brain Res Bull* 25:339–344.
- Rosenstein RE, Chuluyan HE, Pereyra EN & Cardinali DP (1989) Release and effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on rat pineal melatonin production in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 9:207–219.
- Rozen S & Skaletsky H (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386.
- Rüppel R & Olcese J (1991) Bovine pinealocytes in monolayer culture: studies on the adrenergic regulation of melatonin secretion. *Endocrinology* 129:2655–2662.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC & O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298:2211–2213.
- Rusak B & Yu GD (1993) Regulation of melatonin-sensitivity and firing-rate rhythms of hamster suprachiasmatic nucleus neurons: pinealectomy effects. *Brain Res* 602:200–204.
- Ryseck RP & Bravo R (1991) c-jun, jun b, and jun d differ in their binding affinities to AP-1 and cre consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6:533–542.

## S

- Sanada K, Okano T & Fukada Y (2002) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-pas transcription factor BMAL1. *J Biol Chem* 277:267–271.
- Santana C, Guerrero JM & Reiter RJ (1989) Effects of either forskolin, the 1,9-dideoxy derivative of forskolin, or 8-bromocyclic AMP on cyclic AMP and melatonin production in the syrian hamster pineal gland in organ culture. *Neurosci Lett* 103:338–342.
- Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ, Gonzalez-Brito A & Menendez-Pelaez A (1988) Forskolin, an activator of adenylate cyclase activity, promotes large increases in n-acetyl transferase activity and melatonin production in the syrian hamster pineal gland only during the late dark period. *Biochem Biophys Res Commun* 155:209–215.
- Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ & Menendez-Pelaez A (1989) Role of postsynaptic alpha-adrenergic receptors in the beta-adrenergic stimulation of melatonin production in the syrian hamster pineal gland in organ culture. *J Pineal Res* 7:13–22.
- Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ, Puig-Domingo M & Gonzalez-Brito A (1988) Stimulatory effect of isoproterenol but not of dibutyryl cyclic AMP on N-acetyltransferase activity and melatonin content of syrian hamster pineal gland in organ culture. *Neuroendocrinology* 48:229–234.
- Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ & Troiani ME (1988) The in vitro activation of cyclic AMP production by either forskolin or isoproterenol in the syrian hamster pineal during the day is not accompanied by an increase in melatonin production. *Biochem Biophys Res Commun* 157:930–936.
- Santana C, Menendez-Pelaez A, Reiter RJ & Guerrero JM (1990) Treatment with forskolin for 8 hours during the day increases melatonin synthesis in the syrian hamster pineal gland in organ culture: the long lag period is required for rna synthesis. *J Neurosci Res* 25:545–548.

- Sassone-Corsi P (1995) Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:355–377.
- Sassone-Corsi P (1998) Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* 30:27–38.
- Sassone-Corsi P, Ransone LJ & Verma IM (1990) Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor JUN/AP-1 activates cAMP-responsive enhancer elements. *Oncogene* 5:427–431.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA & Hogenesch JB (2004) A functional genomics strategy reveals *ROR $\alpha$*  as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:527–537.
- Sato TK, Yamada RG, Ukai H, Baggs JE, Miraglia LJ, Kobayashi TJ, Welsh DK, Kay SA, Ueda HR & Hogenesch JB (2006) Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat Genet* 38:312–319.
- Schaad NC & Klein DC (1992) Characterization of alpha 2-adrenergic receptors on rat pinealocytes. *Endocrinology* 130:2804–2810.
- Schaad NC, Parfitt A, Russell JT, Schaffner AE, Korf HW & Klein DC (1993) Single-cell [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> analysis and biochemical characterization of pinealocytes immobilized with novel attachment peptide preparation. *Brain Res* 614:251–256.
- Schaad NC, Vanecek J, Kosar E, Aubry JM & Schulz PE (1995) Adrenergic control of rat pineal no synthase. *J Neurochem* 65:935–938.
- Schaad NC, Vanecek J, Rodriguez IR, Klein DC, Holtzclaw L & Russell JT (1995) Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 47:923–933.
- Schomerus C, Korf HW, Laedtke E, Weller JL & Klein DC (2000) Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem* 75:2123–2132.
- Schomerus C, Laedtke E & Korf HW (1995) Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem Int* 27:163–175.
- Schomerus C, Laedtke E & Korf HW (2003) Norepinephrine-dependent phosphorylation of the transcription factor cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding protein in bovine pinealocytes. *J Pineal Res* 34:103–109.
- Schomerus C, Laedtke E & Korf HW (2004) Activation of arylalkylamine N-acetyltransferase by phorbol esters in bovine pinealocytes suggests a novel regulatory pathway in melatonin synthesis. *J Neuroendocrinol* 16:741–749.
- Schomerus C, Laedtke E, Olcese J, Weller JL, Klein DC & Korf HW (2002) Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res* 309:417–428.
- Schuhler S, Pitrosky B, Kirsch R & Pévet P (2002) Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behav Brain Res* 133:343–350.
- Seidel A, Kantarjian A & Vollrath L (1990) A possible role for cyclic guanosine monophosphate in the rat pineal gland. *Neurosci Lett* 110:227–231.
- Sáez JC, Moreno AP & Spray DC (1994) Norepinephrine induces Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 16:57–64.
- Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM & Weaver DR (2000) Targeted disruption of the *mper3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 20:6269–6275.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF & Reppert SM (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19:1261–1269.
- Shilatifard A (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75:243–269.
- Shinohara K, Tominaga K, Isobe Y & Inouye ST (1993) Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J Neurosci* 13:793–800.
- Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, Emson photopériode courte, Hillyard CJ, Girgis S & MacIntyre I (1986) Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* 70:187–192.
- Silver R, Lehman MN, Gibson M, Gladstone WR & Bittman EL (1990) Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Res* 525:45–58.
- Silver R, LeSauter J, Tresco PA & Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810–813.
- Simonneaux V, Ebadi M & Bylund DB (1991) Identification and characterization of alpha 2d-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol Pharmacol* 40:235–241.
- Simonneaux V, Ouichou A, Craft C & Pévet P (1994) Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J Neurochem* 62:2464–2471.
- Simonneaux V, Ouichou A, Pévet P, Masson-Pévet M, Vivien-Roels B & Vaudry H (1989) Kinetic study of melatonin release from rat pineal glands using a perfusion technique. *J Pineal Res* 7:63–83.
- Simonneaux V, Poirel VJ, Garidou ML, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E & Pévet P (2004) Daily rhythm and

- regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 120:164–172.
- Simonneaux V & Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55:325–395.
- Simonneaux V, Rodeau JL, Calgari C & Pévet P (1999) Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. *Eur J Neurosci* 11:725–728.
- Sitaram BR & Lees GJ (1978) Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* 31:1021–1026.
- Sitaram BR, Sitaram M, Traut M & Chapman CB (1995) Nyctohemeral rhythm in the levels of s-adenosylmethionine in the rat pineal gland and its relationship to melatonin biosynthesis. *J Neurochem* 65:1887–1894.
- Skorupa AL, Garidou ML, Bothorel B, Saboureau M, Pévet P, Neto JC & Simonneaux V (2003) Pineal melatonin synthesis and release are not altered throughout the estrous cycle in female rats. *J Pineal Res* 34:53–59.
- Slotten HA, Pitrosky B & Pévet P (1999) Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 14:347–353.
- Smith M, Burke Z, Humphries A, Wells T, Klein D, Carter D & Baler R (2001) Tissue-specific transgenic knockdown of FOS-related antigen 2 (fra-2) expression mediated by dominant negative fra-2. *Mol Cell Biol* 21:3704–3713.
- Smith TL, Eichberg J & Hauser G (1979) Postsynaptic localization of the alpha receptor-mediated stimulation of phosphatidylinositol turnover in pineal gland. *Life Sci* 24:2179–2184.
- Sng JCG, Taniura H & Yoneda Y (2004) A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* 27:606–612.
- Snyder SH, Axelrod J, Fisher JE & Wurtman RJ (1964) Neural and photic regulation of 5-hydroxytryptophan decarboxylase in the rat pineal gland. *Nature* 203:981–982.
- Snyder SH, Axelrod J, Wurtman RJ & Fisher JE (1965) Control of 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in the rat pineal gland by sympathetic nerves. *J Pharmacol Exp Ther* 147:371–375.
- Spessert R, Layes E & Vollrath L (1993) Adrenergic stimulation of cyclic GMP formation requires no-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes. *J Neurochem* 61:138–143.
- Spessert R, Rapp M, Jastrow H, Karabul N, Blum F & Vollrath L (2000) A differential role of CREB phosphorylation in cAMP-inducible gene expression in the rat pineal. *Brain Res* 864:270–280.
- Stankov B, Lucini V, Mariani M, Scaglione F, Demartini G & Fraschini F (1990) Alpha-1 adrenoceptor involvement in the control of melatonin secretion in the golden hamster. *J Pineal Res* 9:21–28.
- Stehle J, Reuss S & Vollrath L (1989) Day-night differences in the sensitivity of adrenoceptors in the syrian hamster pineal gland: an in vivo iontophoretic study. *Brain Res* 488:275–282.
- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P & Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365:314–320.
- Stehle JH, Foulkes NS, Pévet P & Sassone-Corsi P (1995) Developmental maturation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. *Mol Endocrinol* 9:706–716.
- Stehle JH, von Gall C & Korf HW (2001) Analysis of cell signalling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *Eur J Neurosci* 14:1–9.
- Stehle JH, von Gall C & Korf HW (2002) Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57bl mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res* 309:173–182.
- Steigedal TS, Bruland T, Misund K, Thommesen L & Laegreid A (2007) Inducible cAMP early repressor suppresses gastrin-mediated activation of *cyclin d1* and *c-fos* gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1062–G1069.
- Steinlechner S, King TS, Champney TH, Richardson BA & Reiter RJ (1985) Pharmacological studies on the regulation of N-acetyltransferase activity and melatonin content of the pineal gland of the syrian hamster. *J Pineal Res* 2:109–119.
- Steinlechner S, King TS, Champney TH, Spanel-Borowski K & Reiter RJ (1984) Comparison of the effects of beta-adrenergic agents on pineal serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content in two species of hamsters. *J Pineal Res* 1:23–30.
- Stephan FK & Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1583–1586.
- Strack AM, Sawyer WB, Marubio LM & Loewy AD (1988) Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res* 455:187–191.
- Strada SJ, Klein DC, Weller J & Weiss B (1972) Effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. *Endocrinology* 90:1470–1475.
- Su M, Bansal AK, Mantovani R & Sodek J (2005) Recruitment of Nuclear Factor Y to the inverted CCAAT element (ICE) by c-JUN and e1a stimulates basal transcription of the bone sialoprotein gene in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 280:38365–38375.
- Sugden AL, Sugden D & Klein DC (1986) Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J Biol Chem* 261:11608–11612.
- Sugden D (1990) 5-hydroxytryptamine amplifies beta-adrenergic stimulation of N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *J Neurochem* 55:1655–1658.

- Sugden D (1990) Beta-adrenergic regulation of cyclic GMP in rat pinealocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 167:835–841.
- Sugden D (1991) Down-regulation of pinealocyte protein kinase C: effect on alpha 1-adrenergic potentiation of beta-adrenoceptor stimulation of cyclic AMP accumulation and induction of serotonin N-acetyltransferase activity. *J Neurochem* 57:216–221.
- Sugden D, Anwar N & Klein DC (1996) Rat pineal alpha 1-adrenoceptor subtypes: studies using radioligand binding and reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. *Br J Pharmacol* 118:1246–1252.
- Sugden D, Ceña V & Klein DC (1987) Hydroxyindole O-methyltransferase. *Methods Enzymol* 142:590–596.
- Sugden D & Klein DC (1984) Rat pineal alpha 1-adrenoceptors: identification and characterization using [125I]iodo-2-[beta-(4-hydroxyphenyl)-ethylaminomethyl]tetralone. *Endocrinology* 114:435–440.
- Sugden D & Klein DC (1987) A cholera toxin substrate regulates cyclic GMP content of rat pinealocytes. *J Biol Chem* 262:7447–7450.
- Sugden D & Klein DC (1988) Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem* 50:149–155.
- Sugden D, Namboodiri MA, Klein DC, Pierce JE, Grady R & Mefford IN (1985) Ovine pineal alpha 1-adrenoceptors: characterization and evidence for a functional role in the regulation of serum melatonin. *Endocrinology* 116:1960–1967.
- Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP & Anderson WB (1985) Activation of protein kinase c potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314:359–361.
- Sugden D, Weller JL, Klein DC, Kirk KL & Creveling CR (1984) Alpha-adrenergic potentiation of beta-adrenergic stimulation of rat pineal N-acetyltransferase. studies using cirazoline and fluorine analogs of norepinephrine. *Biochem Pharmacol* 33:3947–3950.
- Sugden LA, Sugden D & Klein DC (1987) Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem* 262:741–745.
- Sumová A, Trávníčková Z & Illnerová H (2000) Spontaneous *c-fos* rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus: location and effect of photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2262–R2269.
- Sumová A, Trávníčková Z, Peters R, Schwartz WJ & Illnerová H (1995) The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7754–7758.
- Sun P & Maurer RA (1995) An inactivating point mutation demonstrates that interaction of cAMP response element binding protein (CREB) with the CREB binding protein is not sufficient for transcriptional activation. *J Biol Chem* 270:7041–7044.
- Sun X, Deng J, Liu T & Borjigin J (2002) Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4686–4691.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G & Lee CC (1997) Rigi1, a putative mammalian ortholog of the drosophila period gene. *Cell* 90:1003–1011.
- Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H & Iba H (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-FOS and Fra-2. *Nucleic Acids Res* 19:5537–5542.

## T

- Takahashi Y, Okamura H, Yanaihara N, Hamada S, Fujita S & Iбата Y (1989) Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res* 497:374–377.
- Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH & Okamura H (2000) Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *period1* and *period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci* 12:4557–4561.
- Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N & Okamura H (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 3:167–176.
- Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW & Okamura H (1998) A light-independent oscillatory gene *mper3* in mouse SCN and ovt. *EMBO J* 17:4753–4759.
- Tamarkin L, Baird CJ & Almeida OF (1985) Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227:714–720.
- Tamarkin L, Hollister CW, Lefebvre NG & Goldman BD (1977) Melatonin induction of gonadal quiescence in pinealectomized syrian hamsters. *Science* 198:953–955.
- Tamarkin L, Westrom WK, Hamill AI & Goldman BD (1976) Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* 99:1534–1541.
- Tamaru T, Isojima Y, Yamada T, Okada M, Nagai K & Takamatsu K (2000) Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein *bmal1* during the mammalian clock resetting. *J Neurosci* 20:7525–7530.
- Tamotsu S, Schomerus C, Stehle JH, Roseboom PH & Korf HW (1995) Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 282:219–226.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H & Reiter RJ (2007) Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res* 43:317–320.

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

Teclerian-Mesbah R, Kalsbeek A, Buijs RM & Pévet P (1997) Oxytocin innervation of spinal preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion in the rat. *Cell Tissue Res* 287:481–486.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M & Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the drosophila period gene. *Nature* 389:512–516.

Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H & Shibata S (2003) Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6795–6800.

Tessonnaud A, Locatelli A, Caldani M & Viguiert-Martinez MC (1995) Bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei alter the nocturnal melatonin secretion in sheep. *J Neuroendocrinol* 7:145–152.

Tominaga K, Shinohara K, Otori Y, Fukuhara C & Inouye ST (1992) Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3:809–812.

Tournier BB, Dardente H, Vuillez P, Pévet P & Challet E (2007) Expression of TGF $\alpha$  in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Neuroscience* 145:1138–1143.

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

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

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

Tupler R, Perini G & Green MR (2001) Expressing the human genome. *Nature* 409:832–833.

Tuulivaara A & Koistinaho J (1991) Fos-like immunoreactivity in cultured rat pinealocytes. *Histochemistry* 96:401–404.

Tzavara ET, Pouille Y, Defer N & Hanoune J (1996) Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11208–11212.

## U

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

Uz T, Qu T, Sugaya K & Manev H (2002) Neuronal expression of arylalkylamine N-acetyltransferase (*Aanat*) mRNA in the rat brain. *Neurosci Res* 42:309–316.

## V

Vacas MI, Lowenstein PR & Cardinali DP (1979) Characterization of a cytosol progesterone receptor in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* 29:84–89.

(van der Horst *et al.*, 1999)

van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH & Yasui A (1999) Mammalian CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627–630.

Vanecek J (1998) Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78:687–721.

Vanecek J, Sugden D, Weller J & Klein DC (1985) Atypical synergistic  $\alpha$  1- and  $\beta$ -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116:2167–2173.

Vaughan GM (1986) Human melatonin in physiologic and diseased states: neural control of the rhythm. *J Neural Transm Suppl* 21:199–215.

Vaughan GM, Lasko J, Coggins SH, Pruitt BA & Mason AD (1986) Rhythmic melatonin response of the syrian hamster pineal gland to norepinephrine in vitro and in vivo. *J Pineal Res* 3:235–249.

Vaughan GM, Pruitt BA & Mason AD (1987) Nyctohemeral rhythm in melatonin response to isoproterenol in vitro: comparison of rats and syrian hamsters. *Comp Biochem Physiol C* 87:71–74.

Vaughan GM & Reiter RJ (1986) Pineal dependence of the syrian hamster's nocturnal serum melatonin surge. *J Pineal Res* 3:9–14.

Vaughan GM & Reiter RJ (1987) The syrian hamster pineal gland responds to isoproterenol in vivo at night. *Endocrinology* 120:1682–1684.

Venkataraman V, Duda T & Sharma RK (1998) The  $\alpha$ (2d/a)-adrenergic receptor-linked membrane guanylate cyclase: a new signal transduction system in the pineal gland. *FEBS Lett* 427:69–73.

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey photopériode longue, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW & Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719–725.

Vivien-Roels B, Pévet P, Masson-Pévet M & Canguilhem B (1992) Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the european hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 86:239–247.

Voisin P, Namboodiri MA & Klein DC (1984) Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem* 259:10913–10918.

von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, Kopp MD, Dehghani F, Korf HW & Stehle JH (1998) Creb in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, pacap, and melatonin for clockwork access. *J Neurosci* 18:10389–10397.

von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH & Stehle JH (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5:234–238.

von Gall C, Lewy A, Schomerus C, Vivien-Roels B, Pev̇t P, Korf HW & Stehle JH (2000) Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient c57bl mice and melatonin-proficient c3h mice. *Eur J Neurosci* 12:964–972.

von Gall C, Lewy A, Schomerus C, Vivien-Roels B, Pévet P, Korf HW & Stehle JH (2000) Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57bl mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 12:964–972.

von Gall C, Schneider-Hüther I, Pfeffer M, Dehghani F, Korf HW & Stehle JH (2001) Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ. *J Neuroendocrinol* 13:313–316.

von Gall C, Stehle JH & Weaver DR (2002) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309:151–162.

Vuilleumier R, Boeuf G, Fuentes M, Gehring WJ & FalconJ (2007) Cloning and early expression pattern of two melatonin biosynthesis enzymes in the turbot (*scophthalmus maximus*). *Eur J Neurosci* 25:3047–3057.

Vuillez P, Jacob N, Teclerariam-Mesbah R & Pévet P (1996) In syrian and european hamsters, the duration of sensitive phase to light of the suprachiasmatic nuclei depends on the photoperiod. *Neurosci Lett* 208:37–40.

## W

Waeber G & Habener JF (1991) Nuclear translocation and DNA recognition signals colocalized within the bzip domain of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB. *Mol Endocrinol* 5:1431–1438.

Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, Brown GM & Wang YT (1999) Differential modulation of gabaa receptor function by Mel1a and Mel1b receptors. *Nat Neurosci* 2:401–403.

Wang J, Andrews H & V Thukral V (1992) Presynaptic glutamate receptors regulate noradrenaline release from isolated nerve term *J Neurochem* 58:204–211.

Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S & Yoshimura T (2004) Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145:1546–1549.

Weaver DR, Liu C & Reppert SM (1996) Nature's knockout: the mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10:1478–1487.

Weaver DR & Reppert SM (1996) The mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8:109–112.

Weiss B (1971) On the regulation of adenylyl cyclase activity in the rat pineal gland. *Ann N Y Acad Sci* 185:507–519.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M & Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14:697–706.

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

Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS & Kay SA (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* 14:2289–2295.

White BH & Klein DC (1995) Stimulation of cyclic GMP accumulation by sodium nitroprusside is potentiated via a Gs mechanism in intact pinealocytes. *J Neurochem* 64:711–717.

Williams T, Admon A, Lüscher B & Tjian R (1988) Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* 2:1557–1569.

Woychik NA & Hampsey M (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108:453–463.

## Y

Yamada H, Ogura A, Koizumi S, Yamaguchi A & Moriyama Y (1998) Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci* 18:4946–4952.

Yamada H, Yamamoto A, Yodozawa S, Kozaki S, Takahashi M, Morita M, Michibata H, Furuichi T, Mikoshiba K & Moriyama Y (1996) Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 21:175–191.

Yamada H, Yatsushiro S, Ishio S, Hayashi M, Nishi T, Yamamoto A, Futai M, Yamaguchi A & Moriyama Y (1998) Metabotropic glutamate receptors negatively

regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci* 18:2056–2062.

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

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH & Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334:494–498.

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Menzel P, Rivier J & Montminy MR (1990) Characterization of a bipartite activator domain in transcription factor CREB. *Cell* 60:611–617.

Yamamoto S, Shigeyoshi Y, Ishida Y, Fukuyama T, Yamaguchi S, Yagita K, Moriya T, Shibata S, Takashima N & Okamura H (2001) Expression of the *per1* gene in the hamster: brain atlas and circadian characteristics in the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 430:518–532.

Yamauchi T & Fujisawa H (1979) Activation of tryptophan 5-monoxygenase by calcium-dependent regulator protein. *Biochem Biophys Res Commun* 90:28–35.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M & Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682–685.

Yan L, Takekida S, Shigeyoshi Y & Okamura H (1999) *Per1* and *per2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* 94:141–150.

Yie SM & Brown GM (1995) Effects of sex hormones on the pineal response to isoproterenol and on pineal beta-adrenergic receptors. *Neuroendocrinology* 62:93–100.

Yu L, Schaad NC & Klein DC (1993) Calcium potentiates cyclic AMP stimulation of pineal arylalkylamine N-acetyltransferase. *J Neurochem* 60:1436–1443.

production by the chick pineal gland and retina. *Pol J Pharmacol* 54:61–66.

Zhang B, Liu S, Perpetua MD, Walker WH & Harbrecht BG (2004) Cytokines increase CRE binding but decrease CRE-mediated reporter activity in rat hepatocytes by increasing c-JUN. *Hepatology* 39:1343–1352.

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

Zhao ZY & Touitou Y (1993) Kinetic changes of melatonin release in rat pineal perfusions at different circadian stages. effects of corticosteroids. *Acta Endocrinol (Copenh)* 129:81–88.

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A & Lee CC (2001) Nonredundant roles of the *mper1* and *mper2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105:683–694.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR & Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20:1103–1110.

## Z

Zatz M, Keabian JW, Romero JA, Lefkowitz RJ & Axelrod J (1976) Pineal beta adrenergic receptor: correlation of binding of 3H-L-alprenolol with stimulation of adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 196:714–722.

Zatz M & O'Dea RF (1976) Regulation of protein kinase in rat pineal: increased Vmax in supersensitive glands. *J Cyclic Nucleotide Res* 2:427–439.

Zatz M & Romero JA (1978) Effects of calcium-free medium on the induction of serotonin N-acetyltransferase in the rat pineal. *Biochem Pharmacol* 27:2549–2553.

Zawilska JB & Sadowska M (2002) Prolonged treatment with glucocorticoid dexamethasone suppresses melatonin



# *Annexes*



# Table des illustrations

## *Introduction générale*

<b>Figure 1</b> : L'horloge circadienne endogène est située dans les NSC. Représentation schématique d'un actogramme de souris en conditions LD, DD, suite à une lésion puis une greffe des NSC.	11
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique des boucles de régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes horloges dans les NSC chez les mammifères.	15
<b>Figure 3</b> : Effet de la lumière sur les décalages de phases de l'activité locomotrice à différents moments du cycle circadien.	19
<b>Figure 4</b> : Intégration de la photopériode par les NSC. (A) Exemples de rythmes diurnes et nocturnes modifiés par la photopériode au sein des NSC.	21
<b>Figure 5</b> : Les oscillations visibles dans les organes périphériques résultent de la synchronisation des oscillations individuelles des cellules par des facteurs externes.	24
<b>Figure 6</b> : Schéma de la voie de transmission du signal lumineux vers la glande pinéale représenté sur une coupe sagittale de cerveau de rat.	27
<b>Figure 7</b> : La photopériode régule l'activité sexuelle chez le hamster syrien via la mélatonine.	30
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des différentes hypothèses du mode d'action de la mélatonine sur le contrôle des fonctions saisonnières.	31
<b>Figure 9</b> : Voie métabolique de biosynthèse des indole-amines dans la glande pinéale.	40
<b>Figure 10</b> : Structure de la protéine AA-NAT.	42
<b>Figure 11</b> : Variations journalières des récepteurs adrénergiques, de la NA, de l'AA-NAT et de la mélatonine dans la glande pinéale de rat et de hamster syrien.	45
<b>Figure 12</b> : La stimulation des récepteurs $\alpha$ 1-adrénergiques potentialise l'effet de la stimulation des récepteurs $\beta$ 1-adrénergiques sur l'activité de l'AA-NAT dans la glande pinéale de rat.	49
<b>Figure 13</b> : Réponses calciques enregistrées dans des pinéaloctes en culture.	51
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique des voies de signalisation conduisant à la potentialisation de la formation d'AMPc (A) et de GMPc (B) dans des pinéaloctes de rat.	53
<b>Figure 15</b> : Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'AA-NAT dans la glande pinéale de rat.	55
<b>Figure 16</b> : Rythme journalier de l'expression de l'ARNm et de l'activité de l'AA-NAT dans la glande pinéale de rat.	60
<b>Figure 17</b> : Rythme journalier de synthèse de mélatonine dans la glande pinéale de hamster sibérien en photopériode longue et en photopériode courte.	61
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique des événements cellulaires à la base de la transcription des gènes dans les cellules eucaryotes.	66

<b>Figure 19</b> : Composition en séquences régulatrices du promoteur de l'Aa-nat de rat.	<b>68</b>
<b>Figure 20</b> : Structure générale des protéines à domaines bZIP.	<b>70</b>
<b>Figure 21</b> : Profils d'expression et d'activation de CREB dans la glande pinéale de rat.	<b>72</b>
<b>Figure 22</b> : Structure du gène <i>CREM</i> et des diverses isoformes traduites.	<b>75</b>
<b>Figure 23</b> : Rôle de la protéine ICER dans l'établissement du rythme d'expression de l'Aa-nat.	<b>77</b>
<b>Figure 24</b> : Structure des protéines c-FOS et c-JUN.	<b>80</b>
<b>Figure 25</b> : Profil temporel de fixation des protéines AP-1 sur les séquences TRE dans la glande pinéale de rat.	<b>83</b>

## ***Matériel et Méthodes***

<b>Figure 26</b> : Séquence d'images représentant les différentes étapes de la quantification. ....	<b>100</b>
<b>Figure 27</b> : Effet de la modification de la taille des particules et du seuil sur la quantification de l'expression journalière de la protéine ICER. ....	<b>102</b>
<b>Figure 28</b> : Variations journalière de l'expression de la protéine ICER dans la glande pinéale de hamster syrien. ....	<b>103</b>

## ***Résultats***

<b>Figure 29</b> : Induction de l'expression des protéines pCREB et c-FOS en début de nuit dans la glande pinéale de hamsters syrien maintenus en LL. ....	<b>117</b>
<b>Figure 30</b> : Induction de l'expression de la protéine c-FOS en milieu de jour dans la glande pinéale de hamsters syrien en LD et après 3 jours en LL. ....	<b>119</b>
<b>Figure 31</b> : Expression de la protéine ICER en milieu de jour en LL dans la glande pinéale de hamster syrien. ....	<b>121</b>
<b>Figure 32</b> : Effet de l'inhibition de la synthèse protéique nocturne sur l'induction différentielle diurne des ARNm de c-fos (A) et de l'Aa-nat (B) par des agonistes adrénergiques dans la glande pinéale de hamster syrien. ....	<b>122</b>
<b>Figure 33</b> : Profil d'expression photopériodique des protéines pCREB et c-FOS dans la glande pinéale de hamster syrien.....	<b>124</b>
<b>Figure 34</b> : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueurs d'activation de la glande pinéale de hamster syrien <i>ex vivo</i> .....	<b>126</b>
<b>Figure 35</b> : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueur d'activation de la glande pinéale de hamster syrien <i>ex vivo</i> . ....	<b>129</b>
<b>Figure 36</b> : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueur d'activation de la glande pinéale de hamster syrien <i>ex vivo</i> . ....	<b>130</b>

<b>Figure 37</b> : Restriction temporelle diurne de l'induction de marqueur d'activation de glandes pinéales de hamster syrien <i>ex vivo</i> . .....	<b>132</b>
---	------------

## ***Discussion***

<b>Figure 38</b> : Modèle de régulation de l'expression nocturne de l'ARNm de l' <i>Aa-nat</i> par la balance d'expression de pCREB et d'ICER dans la glande pinéale du rat et du hamster syrien. ....	<b>137</b>
<b>Figure 39</b> : La transcription nocturne de l' <i>Aa-nat</i> dans la glande pinéale du hamster syrien nécessite la synthèse de protéines activatrices en début de nuit. lorsque l'expression est maximale. ....	<b>139</b>
<b>Figure 40</b> : Modèle de régulation de l'expression nocturne de l'ARNm de l' <i>Aa-nat</i> par la balance d'expression des protéines AP-1 dans la glande pinéale de rat. ....	<b>143</b>
<b>Figure 41</b> : Rôle proposé de la balance temporelle d'expression de pCREB, ICER et des protéines AP-1 dans l'activation/répression de la transcription nocturne de l' <i>Aa-nat</i> dans la glande pinéale de hamster syrien. ....	<b>145</b>
<b>Figure 42</b> : L'inhibition de la synthèse protéique en milieu de nuit permet d'induire une expression prolongée de l'ARNm de l' <i>Aa-nat</i> en début de jour suivant. ....	<b>149</b>
<b>Figure 43</b> : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur la restriction diurne de l'activation de la glande pinéale chez le hamster syrien. ....	<b>151</b>
<b>Figure 44</b> : Le blocage diurne de l'induction de l' <i>Aa-nat</i> serait dû à la synthèse d'une protéine inhibitrice durant la nuit précédente.....	<b>159</b>
<b>Figure 45</b> : Modèle expliquant le rôle de la fenêtre temporelle de restriction diurne dans le codage de l'information photopériodique par la glande pinéale chez le hamster syrien. ....	<b>163</b>

## Liste des publications

**Salingre A, Klosen P, Pévet P and Simonneaux V.** 2009 Diurnal blockade of NE-signaling may explain the daytime gating of gene expression in the Syrian hamster pineal gland. Article soumis dans *Journal of Neuroendocrinology*.

**Simonneaux V, Sinitskaya N, Salingre A, Garidou ML, Pevet P.** 2006 Rat and Syrian hamster: two models for the regulation of AANAT gene expression. *Chronobiol Int.*; 23(1-2):351-9. Review.

**Sinitskaya N, Salingre A, Klosen P, Revel FG, Pevet P and Simonneaux V.** 2006 Differential expression of activator protein-1 proteins in the pineal gland of Syrian hamster and rat may explain species diversity in arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression. *Endocrinology*; 147(11):5052-60.

**Diaz E, Garidou ML, Dardente H, Salingre A, Pevet P and Simonneaux V.** 2003 Expression and regulation of Icer mRNA in the Syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res*; 112(1-2):163-9.

## Liste des communications orales et écrites

**Salingre A, Klosen P, Pévet P and Simonneaux V.** Diurnal blockade of NE-signaling may explain the daytime gating of gene expression in the Syrian hamster pineal gland. Poster, 10<sup>e</sup> "Gordon Research Conference on Pineal Cell Biology" en avril 2008, Barga, Italie.

**Salingre A, Sinitskaya N, Klosen P, Simonneaux V.** Mecanismes impliqués dans le gating diurne de la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale du hamster syrien. Poster et courte présentation orale, 10<sup>e</sup> congrès de l'EPBRS (European Pineal and Biological Rhythm Society) en septembre 2005, Frankfurt, Allemagne.

**Sinitskaya N, Salingre A, Klosen P and Simonneaux V.** Facteurs de transcription dans la glande pinéale du hamster syrien : pERK1/2 est requis pour l'expression nocturne de c-FOS. Poster, 10<sup>e</sup> congrès de l'EPBRS (European Pineal and Biological Rhythm Society) en septembre 2005, Frankfurt, Allemagne.

**Sinitskaya N, Salingre A, Klosen P, Pévet P et Simonneaux V.** Facteurs de transcription et AA-NAT chez le hamster syrien : l'expression de c-FOS est régulée par ERK1/2. Poster, 37<sup>e</sup> congrès de la Société Francophone de Chronobiologie en avril 2005, Strasbourg.

## **Autres articles en co-auteur**

- **Article 3 publié dans *Chronobiology International* en 2006**

**« Rat et hamster syrien : deux modèles de régulation de l'expression du gène de l'AA-NAT »**

- **Article 4 publié dans *Molecular Brain Research* en 2003**

**« Expression et régulation de l'ARNm d'*Icer* dans la glande pinéale du hamster syrien »**

*Signalement bibliographique ajouté par le :*

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Rat And Syrian Hamster: Two Models for The Regulation of AANAT Gene Expression**

Valérie SIMONNEAUX, Natalia SINITSKAYA, Anthony SALINGRE, Marie Laure GARIDOU,  
Paul PEVET

**Chronobiology International, 2006, vol. 23, n° 1 et 2, pages 351 - 359**

**Pages 195-... :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1080/07420520500521962>

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

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



*Signalement bibliographique ajouté par le :*

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Expression and regulation of Icer mRNA in the Syrian hamster pineal gland**

Elena DIAZ, Marie-Laure GARIDOU, Hugues DARDENTE, Anthony SALINGRE, Paul PEVET  
and Valérie SIMONNEAUX

**Molecular Brain Research, 2003, vol. 112, n° 1-2, pages 163-169**

**Publication 4 :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00087-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00087-1)

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

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

