

THÈSE
Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
Neurosciences
par

Marc CUESTA

Modulation sérotonergique différentielle
de l'horloge circadienne principale
entre rongeurs diurnes et nocturnes

Soutenance le 13 Février 2009
devant la commission

Dr. Olivier BOSLER
Dr. Howard COOPER
Pr. Rémy SCHLICHTER
Dr. Paul PÉVET
Dr. Etienne CHALLET

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Invité
Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite remercier, en premier lieu, le **Dr. Mireille Masson-Pévet**, pour m'avoir accueilli au sein du Département de Neurobiologie des Rythmes. Grâce à votre soutien et à votre accueil, j'ai pu réaliser mon DEA, puis ma thèse dans les meilleures conditions.

Merci également au **Dr. Paul Pévet** pour tous les conseils et les critiques constructives qu'il a apportés à mon travail. Je suis content d'avoir pu faire votre connaissance, pour votre culture scientifique, votre pertinence et votre franc parler légendaire.

Je remercie vivement les membres de ce jury qui ont bien voulu accepter de lire et de juger ce travail. Le **Pr. Rémy Schlichter** que je connais depuis les bancs de la fac et qui a participé au développement de mon attrait pour les neurosciences. Le **Dr. Olivier Bosler**, spécialiste des noyaux suprachiasmatiques, qui est familier à l'univers complexe de la sérotonine et des rythmes circadiens. Le **Dr. Howard Cooper**, expert de la rétine, qui connaît bien *Arvicanthis ansorgei* et qui s'intéresse à la diurnalité.

Je tiens à remercier **Sylviane Gourmelen** pour son aide et sa bonne humeur. Tu as été là pour m'aider à prendre soin des animaux pour toutes mes expériences. Tu as toujours été à l'écoute et ce fut vraiment agréable de travailler avec toi ces dernières années.

Un énorme merci au **Dr. Dominique Ciocca**, la « Dame Chronobiotron ». J'ai plus qu'apprécié ton efficacité au travail, ta rapidité de réflexion, ta bonne humeur et ta disponibilité. Tu m'as beaucoup aidé pendant ma thèse, lors des bons et des moins bons moments. Encore merci et surtout ne change pas !

Je fais un clin d'œil au **Dr. Céline Feillet** avec qui j'ai commencé ma thèse lorsqu'elle-même était encore doctorante. Merci pour tous ces bons moments et pour tous tes conseils.

Je veux également remercier le **Dr. Jorge Mendoza**, le « Guerrier Aztèque ». Plus qu'un collègue de bureau, tu es un ami ! Merci de m'avoir formé à toutes ces techniques, merci pour les fous rires qu'on a eu ensemble, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta grande connaissance scientifique. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi et j'espère que dans un futur plus ou moins proche nous collaborerons ensemble. Je suis également honoré d'avoir pu participer à ta progression dans l'apprentissage de la langue Française, même si je ne t'ai pas forcément appris la partie la plus noble de cette langue...

Je remercie le **Dr. André Malan** pour ses conseils d'ordre scientifique, statistique et informatique. J'adresse également mes remerciements au **Dr. David Hicks** pour les nombreuses corrections de mon anglais parfois approximatif. Merci à **Daniel Clesse** pour son implication dans mon travail, sa disponibilité, sa bonne humeur et son bon goût dans l'univers musical. Un merci également pour le **Dr. VJ Poirel** et son aide radioactive.

Je remercie vivement tous les autres membres du laboratoire pour leur sympathie, leur écoute, leur critique qui m'ont permis d'évoluer dans le monde scientifique et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Je veux bien entendu adresser des remerciements spéciaux à mon directeur de thèse, le **Dr. Etienne Challet**. Que de route parcourue ensemble ! Je me souviens encore, lors de mon stage de maîtrise, de t'avoir dit que jamais je ne ferais de thèse...et me voilà aujourd'hui, cinq ans après, tout prêt d'avoir fini ma thèse et cela grâce à toi. C'est toi qui a réussi à développer mon engouement pour la recherche. C'est en te voyant évoluer dans ce monde scientifique si particulier que j'ai eu envie de faire mon DEA, puis ma thèse, le tout sous ta direction. Tes conseils avisés, ta grande culture scientifique, ton esprit critique et ton humour décalé ont accompagné ma formation. J'ai adoré nos discussions scientifiques et nos débats moins scientifiques (vive la clairette et le bon vin rouge)...J'ai adoré ta façon de me former, tu as toujours été disponible, tout en me laissant une grande autonomie. Tu as toujours été là pour moi, dans les bons moments, mais aussi dans les moments plus difficiles. Je pense que plus qu'un mentor et son élève, nous sommes devenus des amis et j'espère que cette amitié perdurera encore longtemps. Merci Etienne.

En dehors des personnes avec qui j'ai travaillé pendant ma thèse, je n'aurais pu aller au bout de cette expérience sans mon entourage proche. C'est donc tout naturellement que je veux adresser d'énormes remerciements à mes **parents**. Merci de m'avoir soutenu toutes ces années. Merci de m'avoir fait prendre goût aux études. Merci de m'avoir poussé à me surpasser. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour tout !

Merci à toute ma famille : **Eric, Fabienne, Marie** et tous les autres qui ont cru en moi.

Merci à tous mes amis, proche du monde scientifique, **Arnaud** (tous ces moments passé au labo et en soirée, pour toi je ne dirais qu'une chose...hardcore...), **Bast** (merci d'avoir été là dans les pires moments comme dans les plus festifs) **Ben** (WOW forever), **Hugues** (merci pour tous tes conseils), **Jérôme** (c'était trop bien la Floride) **Celia, Aurélie², Aurore** et **Alexis**.

Merci également à mes autres amis, pour qui la science relève d'un truc plutôt abstrait, mais qui m'ont malgré tout soutenu : **JP** (mon copain de fac, on va bientôt pouvoir enchaîner les PES), **Vianney** et **Julie** (mon ami d'enfance et sa chérie), **Donatien** et **Caro** (je vous souhaite le meilleur), **Fredo** et **Séverine** (bonne chance pour ta thèse Fredo), **Xavier** (yeah ma poule), **Vincent** (quand tu veux on monte cette assoc pour faire du son), **Jul** (vive le son), **Marie-Pierre** (allez je t'inclue dans mes remerciements quand même), **Marc D** (merci de m'avoir accueilli dans ton appart, pour me laisser végéter lors de l'écriture de cette thèse), **Tony** et **Élodie** (mes nouveaux amis de moi), **Manu** (tu vois je ne t'oublie jamais...), **Marc NP** (surtout ne change pas, l'anti-conformisme vaincra), **Matthieu** (vu que tu squattes tout le temps chez nous), **Florent** (je viens bientôt te voir à Paris) et tous les joueurs du TPT (**Caro, Jessica, Ludo, Thibaut**). Spéciale dédicace à **Marcel Ramirez** que j'espère rencontrer un jour...

Je souhaite bonne chance aux doctorants du laboratoire pour qui la route est encore plus ou moins longue : **Laurent, Julien, Matei, Laura, Domitille** et **Corina** (bon pour toi qui passes ta thèse 4 jours après moi, la route est ultra-courte)

Enfin, je remercie celle qui est au cœur de ma vie et qui m'a toujours soutenu. Merci **Claire**. Cela fait maintenant plus de cinq ans que nous partageons tout, les moments les plus merveilleux, mais également les moments plus durs de remise en question et de doute. Malgré nos erreurs, nous sommes toujours ensemble, plus forts que jamais et prêts à affronter le futur. Cette thèse, je te la dois en grande partie, merci du fond du cœur, je t'aime.

Table des matières

Remerciements	2
Abréviations	8
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	11
I. Diurnes ou nocturnes ?	12
1. L'émergence de la diurnalité chez les Mammifères	12
2. Une tentative de définition	12
3. Une dichotomie valable ?	13
4. Adaptation aux facteurs environnementaux	15
II. Les rythmes circadiens	16
1. Découverte de la rythmicité des organismes	16
2. Définitions et propriétés.....	17
3. Les autres rythmes.....	18
III. L'horloge circadienne principale : les noyaux suprachiasmatiques	18
1. Qu'est-ce qu'une horloge ?	18
2. Localisation de l'horloge.....	19
3. Organisation cellulaire des SCN	20
a. Anatomie des SCN	20
b. Composition neurochimique des SCN.....	21
4. Genèse des oscillations circadiennes	22
a. Découverte des gènes horloges	22
b. La boucle positive : CLOCK et BMAL1	24
c. La boucle négative : PER et CRY	25
d. Les boucles secondaires : REV-ERB et ROR	27
e. Les autres acteurs	28
5. La rythmicité circadienne au sein des SCN	29
a. Activité métabolique	29
b. Activité électrique.....	30
c. Les gènes contrôlés par l'horloge (CCG)	30
d. Le cas du VIP.....	31
e. Les autres peptides	31

IV. Sorties de l'horloge circadienne principale	32
1. La distribution du message circadien	32
2. Horloge, glande pinéale et mélatonine	34
3. Horloge, glandes surrénales et corticostérone.....	35
4. Les structures cérébrales impliquées dans le cycle veille-sommeil .	36
5. La température corporelle	38
6. Les oscillations des gènes horloges hors des SCN	39
V. Synchronisation des rythmes circadiens	39
1. Définition.....	39
2. Les voies d'entrée	40
a. La rétine, interface entre l'environnement et l'horloge.....	40
b. Les feuillets intergénéculés thalamiques (IGL).....	42
c. Les noyaux du raphé	42
d. Les autres entrées.....	42
3. La synchronisation photique.....	43
a. Niveau physiologique.....	43
b. Niveau cellulaire	44
c. Niveau moléculaire	46
4. La synchronisation non-photique.....	48
a. Définition	48
b. Activité, sommeil et sérotonine.....	49
c. Neuropeptide Y.....	51
d. GABA.....	51
e. Créneaux d'obscurité.....	52
f. Mélatonine.....	52
g. Facteurs alimentaires	53
5. Quand le photique rencontre le non-photique	54
a. Pendant la nuit	55
b. Pendant le jour.....	56
VI. Le système sérotonergique	57
1. Données anatomiques	57
a. Les noyaux sérotonergiques	57
b. Afférences	58
c. Efférences.....	58
2. Les neurones sérotonergiques.....	59
a. De la synthèse à la dégradation.....	59
b. Activité électrique.....	60
3. Les récepteurs sérotonergiques	60
a. Les récepteurs 5-HT _{1A}	61

b.	Les récepteurs 5-HT _{1B} et 5-HT _{1D}	62
c.	Les récepteurs 5-HT _{1E} et 5-HT _{1F}	63
d.	Les récepteurs 5-HT _{2A}	63
e.	Les récepteurs 5-HT _{2B}	64
f.	Les récepteurs 5-HT _{2C}	64
g.	Les récepteurs 5-HT ₃	64
h.	Les récepteurs 5-HT ₄	65
i.	Les récepteurs 5-HT ₅	66
j.	Les récepteurs 5-HT ₆	66
k.	Les récepteurs 5-HT ₇	66
4.	Contrôle circadien du système sérotonergique	67
a.	Tryptophane hydroxylase et rythmicité circadienne	67
b.	Sérotonine et rythmicité circadienne.....	67
5.	Rôle de la sérotonine dans les rythmes circadiens	68
a.	Récepteurs sérotonergiques.....	68
b.	Chez le Hamster syrien et la Souris.....	69
c.	Chez le Rat.....	72
	CHAPITRE 2 - OBJECTIFS DE LA THÈSE	75
	CHAPITRE 3 - RÉSULTATS	77
	Article 1: From daily behavioral to hormonal and neurotransmitters rhythms: comparison between diurnal and nocturnal Rat species.	78
	Article 2: Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent	90
	Article 3: New light on the serotonergic paradox in the Rat circadian system.	105
	CHAPITRE 4 - DISCUSSION GÉNÉRALE	138
	I. L'Arvicanthis soudanais, un modèle diurne plus proche de l'Homme	139
1.	Une bimodalité partielle.....	139
2.	Quelques mots sur l'effet « roue ».....	140
3.	Et l'Homme dans tout cela ?	141
4.	L'origine de la bimodalité	141
5.	L'Arvicanthis soudanais, un modèle à la physiologie diurne	142

II. Le système sérotonergique, modulateur de l'horloge circadienne principale	144
1. Synchronisation non-photique	144
a. Le Rat, un rongeur nocturne presque comme les autres.....	144
b. Influence sérotonergique des SCN chez un rongeur diurne.....	146
c. Récepteurs 5-HT impliqués dans la synchronisation non-photique	149
2. Mimétisme photique du système sérotonergique	151
3. Modulation sérotonergique de la synchronisation photique	152
a. Modulation négative chez les rongeurs nocturnes	152
b. Modulation positive chez les rongeurs diurnes.....	154
c. Modulation positive chez les rongeurs nocturnes	156
d. Récepteurs impliqués dans la modulation sérotonergique de la synchronisation photique.....	157
4. Modèle diurne, système sérotonergique, horloge circadienne principale et possibles applications thérapeutiques	160
CHAPITRE 5 - PERSPECTIVES	162
CHAPITRE 6 - BIBLIOGRAPHIE	165
APPENDIX	199

Abréviations

3V : troisième ventricule	CLOCK/Clock : circadian locomotor output cycles kaput
5,7-DHT : 5,7-dihydroxytryptamine	CRE : Ca^{2+} /cAMP-responsive element
5-CT : 5-Carboxamidotryptamine	CREB : Ca^{2+} /cAMP-responsive element binding protein
5-HIAA : 5-hydroxyindole acide acétique	CRH : corticotropin-releasing hormone = hormone libérant l'hormone corticotrope
5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine	CRY/Cry : cryptochrome
5-HTP : 5-hydroxytryptophane	CT : circadian time = temps circadien
8-OH-DPAT : (±)-8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin	DA : dopamine
AADC : aromatic amino-acids decarboxylase = décarboxylase des acides aminés aromatiques	DBP : albumin D-element binding protein
AA-NAT : arylalkylamine N-acétyltransférase	DD : dark-dark = obscurité constante
AC : adénylate cyclase	DEC : differentiated embryo chondrocyte protein
ACTH : adrenocorticotropin hormone = hormone corticotrope	DMH : dorsomedial hypothalamic nucleus = noyau dorsomédial de l'hypothalamus
AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique	DOI : (±)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine
AS19 : (2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(diméthylamino)tetralin	DR4004 : 2a-[4-(4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridyl)butyl]-2a,3,4,5-tetrahydro-bezo[cd]indol-2(1H)-one
AVP : arginine vasopressine	ERK : extracellular signals regulated kinase
bHLH : basic helix loop helix	GABA : γ -aminobutyric acid = acide γ -aminobutyrique
BIMU 8 : 1'-[4-[1-(4-fluorophenyl)-1-H-indol-3-yl]-1-butyl]spiro[iso-benzofuran-1(3H),4'piperidine](Lu28-179), endo-N-(8-methyl-8azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-2,3-dihydro-(1-méthyl)ethyl-2oxo-1-H-benzamidazole-1-carboxamidehydrochloride	GC : guanylate cyclase
BMAL1/bmal1 : brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	GCS : ganglion cervical supérieure
BMY7378 : 8-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione	GHT : geniculo-hypothalamic tract = tractus géniculo-hypothalamique
BNST : bed nucleus of the stria terminalis = noyau du lit de la strie terminale	GMPC : guanylate mono-phosphate cyclique
BRL 15572 : 4-(3-Chlorophenyl)- α -(diphénylméthyl)-1-piperazineethanol	GR113808 : 1-[2-[(Méthylsulfonyl)-amino]éthyl]-4-piperidinyl]methyl 1-méthyl-1H-indole-3-carboxylate
BW 723C86 : α -méthyl-5-(2-thienylméthoxy)-1H-Indole-3-ethanamine	GRP : gastrin releasing peptide = peptide libérant la gastrine
CCG : clock controlled genes = gènes contrôlés par l'horloge	GSK3β : glycogène kinase 3 β
CKI : caséine kinase I	IGL : intergeniculate leaflet = feuillet intergénéculé latéral
	IML : intermediolateral column = colonne intermédolaterale
	LD : light-dark = lumière-obscurité
	LHA : lateral hypothalamic area = aire latérale hypothalamique latérale
	LL : light-light = lumière constante
	LS : lateral septum = septum latéral

L-Trp : L-tryptophane
MA : million d'années
MAO : monoamine oxydase
m-CPBG : 1-(m-Chlorophenyl)biguanide
mCPP : 1-(3-Chlorophenyl)piperazine
MDL 100907 : R-(1)-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-[2(4-fluorophenethyl)]-4-piperidinemethanol
MKC-242 : (S)-5-[3-[(1,4-benzodioxan-2-ylmethyl)amino]propoxy]-1,3-benzodioxole
MPN : *median preoptic nucleus area* = aire préoptique médiane
MSF : *midpoint of sleep on free days*
MT1/MT2 : récepteur 1/2 à la mélatonine
NA : noradrénaline
NAN-190 : 1-(2-methoxyphényl)-4(4-(2-phtalimido)butyl)piperazine
NMDA : N-méthyl D-aspartate
NO : monoxyde d'azote
NOS : NO synthase
NPY : neuropeptide Y
NR1D1 : *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*
NR1D2 : *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2*
NR1F1 : *nuclear receptor subfamily 1, group F, member 1*
NR1F2 : *nuclear receptor subfamily 1, group F, member 2*
NR1F3 : *nuclear receptor subfamily 1, group F, member 3*
NRD : noyau du raphé dorsal
NRM : noyau du raphé médian
OC : *optic chiasma* = chiasma optique
PAC1 : récepteur 1 au PACAP
PACAP : *pituitary adenylate cyclase activating peptide* = peptide activant l'adénylate cyclase pituitaire
PAS : *period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-single minded*
PER/Per : *period*
PK2 : prokinéticine 2
PKA : protéine kinase A
PLC : phospholipase C
PNU 109291 : (S)-(-)-1-[2-[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-methyl-isochroman-6-carboxamide

PVN : *paraventricular nucleus of hypothalamus* = noyau paraventriculaire hypothalamique
PVT : *paraventricular nucleus of thalamus* = noyau paraventriculaire thalamique
REV-ERB/Rev-erb : *reverse viral erythroblastis oncogene product*
RHT : *retino-hypothalamic tract* = tractus rétinohypothalamique
Ro-600175 : (aS)-6-Chloro-5-fluoro- α -methyl-1H-indole-1-ethanamine fumarate
ROR/Ror : *retinoic acid-related orphan receptor*
RORE : *retinoic acid-related orphan receptors response element*
RPE65 : *retinal pigment epithelium enzyme 65*
rPK2 : récepteur à la PK2
S15535 : 1-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-5-yl)-4-(2,3-dihydro-1h-inden-2-yl)-piperazine
SB 200646 : N-(1-Methyl-1H-5-indolyl)-N'-(3-pyridinyl)urea
SB 242084 : 6-Chloro-2,3-dihydro-5-methyl-N-[6-[(2-methyl-3-pyridinyl)oxy]-3-pyridinyl]-1H-indole-1-carboxamide
SB 269970 : (2R)-1-[(3-Hydroxyphenyl)sulfonyl]-2-[2-(4-methyl-1-piperidinyl)ethyl]pyrrolidine
SB 271046 : 5-chloro-N-(4-methoxy-3-piperazin-1-yl-phenyl)-3-methyl-2-benzothiophenesulfonamide
SBP : *serotonin binding protein* = protéine liant la sérotonine
SCN : *suprachiasmatic nucleus* = noyau suprachiasmatique
SERT : *specific serotonin reuptake transporter* : transporteur de recapture spécifique de la sérotonine
SOM : somatostatine
SPV : *subparaventricular zone* = zone subparaventriculaire
TFMPP : N-[3-(trifluorométhyl)phényl]piperazine
TGF α : *transforming growth factor α*
TIM : *timeless*
TPH : tryptophane hydroxylase
TTX : tétrodotoxine
VIP : *vasoactive intestinal peptide* = peptide vasoactif intestinal

VIPR : *VIP receptor* = récepteur au VIP
VLPO : *ventrolateral preoptic area* = aire
préoptique ventrolatérale
VMH : *ventromedial nucleus of
hypothalamus* = noyau ventromédial de
l'hypothalamus.
vTM : *ventral tuberomammillar nucleus* =
noyau tubéromammillaire ventral

WAY-100635 : N-[2-[4-(2-
Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-
pyridinylcyclohexanecarboxamide
WAY-161503 : 8,9-Dichloro-2,3,4,4a-
tetrahydro-1H-pyrazino[1,2-a]quin oxalin-
5(6H)-one
ZT : *zeitgeber time* = donneur de temps

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

I. Diurnes ou nocturnes ?

1. L'émergence de la diurnalité chez les Mammifères

Les données actuelles, obtenues grâce aux études paléontologiques, permettent d'estimer que les plus anciens Mammifères sont apparus sur Terre il y a un peu plus de 200 millions d'années (MA). L'étude des fossiles de ces Mammifères a permis d'envisager que la majorité des animaux appartenant à cette Classe étaient **nocturnes**. En effet, leur **crâne aux vastes orbites** favorisant la vision nocturne, le développement des **trois os de l'oreille interne** (malleus, incus et stapes) améliorant l'ouïe par rapport aux reptiles, ainsi que leur **petite taille adaptée à l'homéothermie**, font partie des arguments en faveur de la nocturnalité des premiers Mammifères (*Hartenberger 2001 ; Kielan-Jaworowska et al. 2004 ; Nicolau et al. 2000*). Le choix de cette niche temporelle nocturne aurait notamment été déterminé par leurs principaux prédateurs, les Dinosaures, qui eux étaient très majoritairement des animaux diurnes, car hétéothermes et donc dépendants d'une source de chaleur extérieure. Les Mammifères ont vécu « dans l'ombre » des Dinosaures pendant toute l'ère du Mésozoïque, soit près de 150 MA, jusqu'à l'extinction de ces derniers, lors de la crise Crétacé/Paléocène, il y a 65 MA. Bien que des indices suggèrent que certains Mammifères étaient déjà diurnes pendant le Mésozoïque, la diurnalité a réellement pris son essor lors de la radiation exceptionnelle des Mammifères, entre -65 et -34 MA. Les Mammifères colonisèrent alors toutes les niches écologiques, dont la **niche temporelle diurne**. À l'heure actuelle, on trouve sur Terre à la fois des Mammifères diurnes et nocturnes. Dès lors une question vient à l'esprit : **qu'est-ce qui différencie ces deux types de Mammifères ?** Avant de tenter de répondre à cette question, il faut définir ce que sont diurnalité et nocturnalité.

2. Une tentative de définition

Classiquement, définir **diurnalité** et **nocturnalité** revient à dire que les animaux sont respectivement **actifs le jour ou la nuit**. Habituellement, on mesure cette activité en plaçant un rongeur dans une cage munie d'une roue en libre accès. L'animal, soumis à un cycle de lumière et d'obscurité (LD), passera une grande partie de son temps à courir dans cette roue pendant sa période d'activité, indiquant sa préférence pour l'une ou l'autre niche temporelle. Ce type d'analyse comportementale est utilisé depuis longtemps chez les rongeurs nocturnes dont *Rattus norvegicus* (Rat ou Rat surmulot), *Mus musculus* (Souris ou Souris domestique), *Mesocricetus auratus* (Hamster syrien ou doré) et *Phodopus sungorus* (Hamster sibérien) (ex.,

Conn et al. 1990 ; Freeman et Goldman 1997 ; Honma et al. 1978 ; Pittendrigh et Daan 1976 ; Weinert et Waterhouse 1998). Les travaux s'intéressant aux rongeurs diurnes sont moins fréquents, même si un certain nombre d'espèces ont été étudiées. On peut les regrouper en trois Familles :

- **Famille des Sciuridés ou Écureuils**, qui comprend notamment *Ammospermophilus leucurus* (Spermophile-antilope à queue blanche ; Pohl 1983) *Spermophilus tridecemlineatus* (Spermophile à treize bandes ; Refinetti 1995) et *Spermophilus citellus* (Spermophile d'Europe ; Hut et al. 1999).

- **Famille des Octodontidés** qui est représentée par *Octodon Degus* (Degu du Chili ; Garcia-Allegue et al. 1999).

- **Famille des Muridés**, où l'on trouve *Arvicanthis niloticus* (Rat du Nil ou Rat roussard du Nil ; Katona et Smale 1997), *Arvicanthis ansorgei* (Arvicanthis soudanais ou Rat roussard du Soudan ; Challet et al. 2002), *Meriones unguiculatus* (Gerbille mongole ; Weinert et al. 2007), *Rhabdomys pumilio* (Souris des champs à quatre rayures ; Schumann et al. 2005) et *Lemniscomys barbarus* (Souris rayée Africaine ; Lahmam et al. 2008).

On pourrait bien évidemment citer d'autres Mammifères diurnes, mais le cadre de notre étude restera majoritairement limité à l'Ordre des Rongeurs. Cependant, il faut garder à l'esprit que **l'Homme est une espèce diurne**, ainsi que la quasi-totalité des espèces de l'Ordre des Primates (Ankel-Simmons et Rasmussen 2008).

3. Une dichotomie valable ?

Quand l'activité locomotrice de ces animaux est analysée, on s'aperçoit que la dichotomie nocturne/diurne n'est pas franche et qu'il existe des **profils d'activités intermédiaires**. Chez les animaux nocturnes, il a été démontré à maintes reprises que leur activité avait lieu essentiellement durant la nuit. Une étude récente a quantifié l'activité de roue de quelques rongeurs nocturnes (Rat, Souris, Hamsters syrien et sibérien), établissant que cette dernière a lieu à plus de **90%** durant la phase nocturne du cycle LD (Refinetti 2006). De plus, leur activité commence le plus souvent juste après l'extinction de la lumière et se termine avant ou au moment où celle-ci se rallume. Le Hamster syrien, par exemple, est très actif en début de nuit, mais quasiment jamais en fin de nuit.

Les travaux menés sur les rongeurs diurnes sont plus surprenants. En effet, au sein d'une même espèce, les individus vont adopter des profils plus ou moins diurnes que l'on peut tenter de résumer en quatre catégories (**Figure 1**).

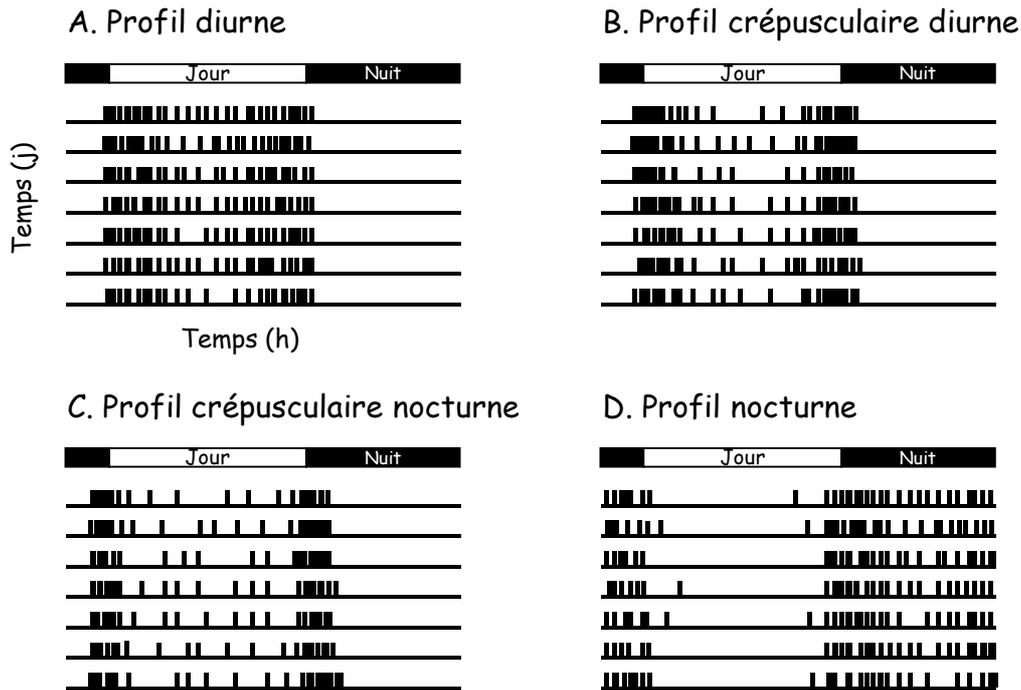


Figure 1 : Actogrammes schématiques des différents profils d'activité de roue chez les rongeurs diurnes placés en cycle LD avec 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (LD 12:12). L'animal est placé dans une cage munie d'une roue ; les tours de roue sont comptabilisés par blocs de 5 min par le biais d'un système d'acquisition. La présentation des données, comme ci-dessus, constitue un **actogramme**.

Alors que certains animaux vont adopter un comportement **clairement diurne** (Figure 1A), d'autres vont avoir tendance à être actifs essentiellement **autour des transitions obscurité/lumière (aube) et lumière/obscurité (crépuscule) avec une composante diurne plus ou moins importante** (Figure 1B et C). D'autres individus encore peuvent même présenter un profil d'activité de type **nocturne** (Figure 1D). De plus, pour les animaux de ces quatre catégories, la phase maximale d'activité a le plus souvent lieu autour des transitions obscurité/lumière et lumière/obscurité, donnant aux profils d'activité locomotrice (actogrammes) un aspect **bimodal**, c'est-à-dire avec deux pics d'activité. Certains évoquent alors une activité « **crépusculaire** ». Le Spermophile d'Europe fait office d'exception chez les rongeurs étudiés, puisque son activité est limitée à la phase de lumière du cycle LD (Hut et al. 1999). Il est important de noter que la bimodalité n'est pas une spécificité des Mammifères diurnes, puisque *Drosophila melanogaster* (Drosophile ou Mouche du vinaigre) par exemple, a également une activité diurne et bimodale (Chang 2006). Bien entendu, tous les Mammifères ne sont pas bimodaux, car des espèces, comme le Mouton (*Ovis aries*) ou le Cheval (*Equus caballus*) ont une activité diurne et unimodale (Piccione et al. 2005).

Contrairement à la nocturnalité, la diurnalité des rongeurs semble être un phénomène moins fortement régulé, car soumis à une certaine plasticité au vu de ces différents profils. L'étude de l'activité locomotrice soulève la question de savoir si ces espèces seraient crépusculaires plutôt que diurnes et auraient donc une physiologie différente de celles des animaux diurnes.

4. Adaptation aux facteurs environnementaux

Les variabilités inter-individuelles au sein d'une même espèce compliquent la tentative de définir diurnalité et nocturnalité. De plus, l'influence des **facteurs environnementaux** ajoute un degré de complexité supplémentaire. En effet, il existe bon nombre de facteurs capables de déplacer la fenêtre temporelle d'activité de l'animal que celui-ci soit nocturne ou diurne. Par exemple, chez l'espèce nocturne *Microtus montanus* (Campagnol des montagnes), les changements saisonniers de la fonction reproductive (variations de la quantité de testostérone en fonction de la photopériode) provoquent chez les mâles un « **switch** » de l'activité de roue qui devient alors diurne (Rowsemitt 1986). *Acomys russatus* (Souris épineuse rousse), une espèce normalement nocturne, devient diurne lorsqu'elle cohabite avec *Acomys cahirinus* (Souris épineuse ou égyptienne), afin d'éviter la compétition alimentaire (Levy et al. 2007). Ces **facteurs écologiques**, qu'ils soient d'ordre sexuel ou nutritionnel et donc fondamentaux pour la survie de l'espèce, influencent fortement le choix de la niche temporelle. Expérimentalement, en déplaçant la fenêtre temporelle d'accès à la nourriture pendant le jour chez des animaux nocturnes, on peut provoquer un switch partiel de leur activité qui leur permet d'anticiper l'heure d'accès à la nourriture (ex., Challet et al. 1997).

Un autre facteur, plus surprenant, est également capable de déplacer la fenêtre d'activité d'un animal : il s'agit de **l'accès à une roue**. Pour étudier son effet, on observe l'enregistrement de l'activité générale de l'animal, à l'aide de capteurs infrarouges ou d'émetteurs implantés dans l'abdomen. Ainsi, chez plusieurs espèces diurnes, comme le Degu du Chili, le Rat du Nil ou la Gerbille mongole, l'activité générale est diurne en absence de roue. Mais dès que ces animaux y ont accès, la composante d'activité nocturne augmente plus ou moins en fonction de l'espèce considérée, jusqu'à l'inversion systématique chez le Degu du Chili (**Figure 2** ; Blanchong et al. 1999 ; Kas et Edgar 1999 ; Ocampo-Garcés et al. 2005 ; Weinert et al. 2007). L'accès à une roue a très probablement une **influence motivationnelle** sur le comportement de l'animal, mais l'intérêt physiologique du déplacement de sa fenêtre temporelle d'activité induite par un tel facteur reste incompris.

Il apparaît au vu de ces résultats que nocturnalité et diurnalité ne sont pas des comportements figés, bien que chaque espèce ait une préférence pour l'un ou l'autre.

Cette préférence doit être régulée d'une manière ou d'une autre et pour tenter de la comprendre, il est inévitable d'étudier l'horloge biologique principale, structure cérébrale distribuant les informations temporelles rythmiques au reste de l'organisme.

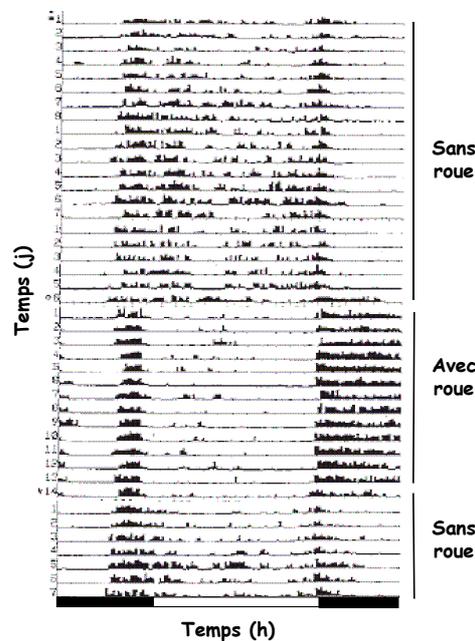


Figure 2 : Actogramme de l'activité générale du Rat du Nil placé en LD 12:12.

Sans accès à la roue, l'animal a une activité diurne bimodale. L'accès à une roue entraîne un déplacement de la fenêtre d'activité qui devient nocturne. Quand on retire l'accès à la roue, l'animal retrouve une activité diurne bimodale.

(D'après Blanchong et al. 1999)

II. Les rythmes circadiens

1. Découverte de la rythmicité des organismes

En 1729, **Jean-Jacques Dortous de Mairan**, un astronome français, constate que le rythme de repli des feuilles de la Sensitive (*Mimosa pudica*), observé en cycle LD, persiste lorsque cette plante est maintenue en obscurité constante (DD). Avec cette observation, il est le premier à mettre en évidence le **caractère endogène** de la rythmicité d'une fonction biologique chez des êtres vivants. Depuis, une rythmicité à l'échelle journalière a été détectée pour de nombreux phénomènes moléculaires ou physiologiques chez bien d'autres organismes végétaux et animaux, qu'ils soient pluricellulaires ou unicellulaires.

2. Définitions et propriétés

La nature endogène des rythmes et leur présence chez une grande majorité des espèces de la biosphère sous-tend le fait que ce caractère a été transmis de génération en génération, car il devait présenter un avantage évolutif pour les espèces. Sur Terre, chaque organisme est soumis aux variations rythmiques de l'environnement, qu'elles soient **journalières** (alternance lumière/obscurité) ou **saisonniers** (modifications respectives de la durée du jour et de la nuit ou des saisons sèches et pluvieuses). Ces changements dynamiques de quantité de lumière, de température ou d'hygrométrie nécessitent que l'organisme s'adapte afin d'être préparé au mieux aux nouvelles conditions de l'environnement. La rythmicité endogène générée par ce que l'on peut nommer une « **horloge** » permet justement cette adaptation. Ainsi, grâce à cette horloge, l'organisme va pouvoir être en phase avec les changements environnementaux (synchronisation externe) et va assurer le maintien de la coordination temporelle entre les diverses fonctions physiologiques (synchronisation interne).

Au sein de l'organisme, il existe différents types de rythmes. Celui auquel nous attacherons le plus d'importance est lié au rythme journalier d'alternance lumière/obscurité d'une période de 24 h. On le nomme rythme **circadien** (du latin *circa* : environ et *dies* : un jour), car il a une période proche de 24 h (comprise entre 21 et 28 h).

Chez les rongeurs, l'un des rythmes circadiens le plus étudié est le **rythme d'activité locomotrice**, précédemment évoqué. Ce rythme présente une alternance entre phases d'activité et de repos. Quand l'animal est soumis à un cycle LD, la période du rythme est d'exactly 24 h (**Figure 3**). En l'absence d'un Zeitgeber (en DD par exemple), les animaux sont en **libre-cours**, c'est-à-dire que leur rythme d'activité locomotrice n'est plus synchronisé à la période du Zeitgeber (24 h en cycle LD), mais exprime une **période endogène** nommée **tau** (τ), qui sera comprise entre 21 et 28 h en fonction de l'espèce considérée. On peut diviser cette période en deux parties dont la signification différera entre animaux diurnes (**Figure 3A**) et nocturnes (**Figure 3B**) :

- Le **jour subjectif** correspond respectivement à la phase d'activité et de repos chez les espèces diurnes et nocturnes.
- La **nuit subjective** correspond respectivement à la phase de repos et d'activité chez les espèces diurnes et nocturnes.

La durée de ce rythme endogène peut également être nommée **jour circadien**, divisé alors en heures circadiennes, pour lesquelles le **temps circadien** (CT) **CT0** correspondra au début du jour subjectif et **CT12** au début de la nuit subjective.

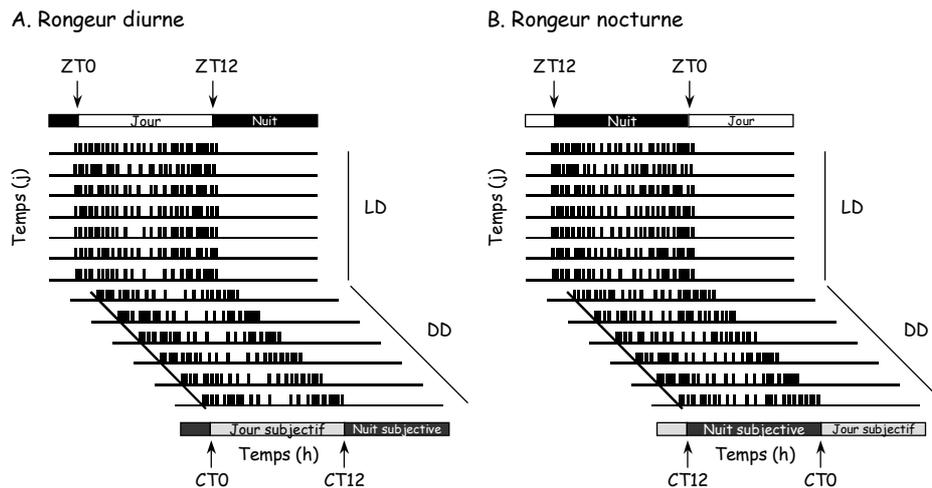


Figure 3 : Rythme d'activité locomotrice d'un rongeur diurne (A) et d'un rongeur nocturne (B).

Les animaux sont d'abord soumis à un cycle lumière/obscurité (LD) pour lequel leur activité est synchronisée à une période de 24 h. Ils sont ensuite placés en obscurité constante (DD) et leur activité locomotrice est en libre cours (période > 24 h).

ZT : temps « zeitgeber » ; CT : temps circadien.

3. Les autres rythmes

Hormis les rythmes circadiens définis précédemment, il existe deux autres catégories de rythmes que nous n'étudierons pas par la suite.

- Les **rythmes ultradiens** : leur période est très inférieure à 24 h. On peut citer les rythmes des battements cardiaques ou de décharge des neurones.
- Les **rythmes infradiens** : leur période est très supérieure à 24 h. Parmi eux, on trouve le cycle menstruel ou le rythme d'hibernation.

III. L'horloge circadienne principale : les noyaux suprachiasmatiques

1. Qu'est-ce qu'une horloge ?

Il est indispensable avant toute chose, de définir le concept **d'horloge biologique**. Pour qu'un système soit considéré comme une horloge, cinq critères doivent être respectés.

- Une horloge doit **générer** des rythmes endogènes (circadiens). En d'autres termes, en l'absence d'informations temporelles extérieures, la rythmicité circadienne doit

persister ce qui la différence de la rythmicité journalière qui disparaît en l'absence de ces informations (car non contrôlée par une horloge).

- Une horloge doit être capable de **percevoir** des informations externes ou internes et de les **intégrer** à son propre fonctionnement rythmique. Ainsi, elle doit pouvoir être **synchronisée** à une période imposée par des facteurs environnementaux nommés **Zeitgebers** (ZT de l'allemand « donneur de temps »), comme le cycle LD qui impose aux rythmes une période d'exactly 24 h.
- Une horloge doit pouvoir **distribuer** un message rythmique au reste de l'organisme.
- Une horloge doit répondre au critère de **compensation thermique** qui permet d'éviter que les variations de température extérieure influent sur la vitesse de fonctionnement des mécanismes de l'horloge.
- Enfin en l'absence de cette horloge, les rythmes de l'organisme doivent être **abolis**.

Les systèmes qui ne remplissent pas toutes ces conditions seront considérés comme des **oscillateurs**.

2. Localisation de l'horloge

Chez les Mammifères, le siège de l'horloge circadienne principale a été déterminé pour la première fois en 1972 par une approche lésionnelle. Ainsi, deux équipes ont montré la même année que la lésion d'une région hypothalamique ventrale nommée **noyaux suprachiasmatiques** (SCN ; **Figure 4**), provoque la perte du rythme de sécrétion de corticostérone (*Moore et Eichler 1972*), ainsi que des rythmes d'activité locomotrice et de prise hydrique (*Stephan et Zucker 1972*).

Mais un autre argument est venu définitivement prouver que les SCN sont assurément le siège de l'horloge circadienne principale. Un greffon de SCN, obtenu chez des **Hamsters syriens mutants tau** (dont les homozygotes ont une période d'environ 20 h), est transplanté chez des Hamsters syriens de type sauvage, rendus arythmiques par une lésion bilatérale des SCN. Les Hamsters syriens de type sauvage possédant le greffon expriment alors un rythme d'activité locomotrice d'une période d'environ 20 h (*Ralph et al. 1990*). Ce résultat indique que la période endogène du donneur est transmise aux sorties de l'horloge du receveur, imposant une rythmicité globale à l'organisme.

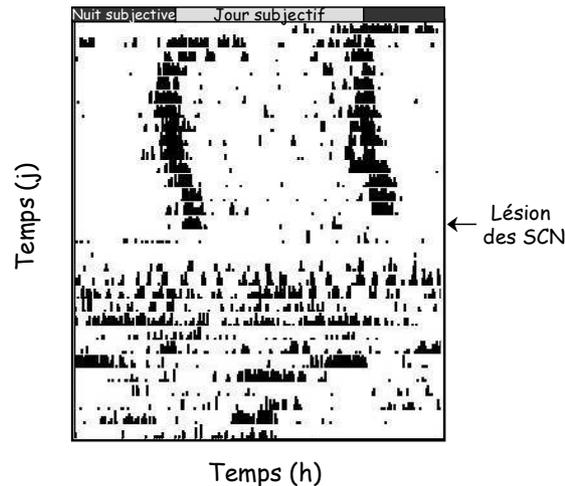


Figure 4 : *Activité locomotrice de l'Arvicanthis soudanais après lésion des SCN.*

L'animal a une période supérieure à 24 h avant la lésion. Après lésion des SCN, le rythme circadien de l'activité locomotrice disparaît, l'animal est arythmique.

(Cuesta et Challet, non publié)

3. Organisation cellulaire des SCN

a. Anatomie des SCN

Les SCN constituent une petite structure paire située dans l'hypothalamus au-dessus du chiasma optique (**Figure 5**). A titre d'exemple chez le Rat, cette structure mesure environ 900 μm de long selon l'axe rostro-caudal, 400 μm de haut selon l'axe dorso-ventral et 425 μm de large selon l'axe médio-latéral (*Van den Pol 1980*). Les neurones suprachiasmatiques sont les plus petits de l'hypothalamus (corps cellulaires de 7 à 10 μm de diamètre ; *Van den Pol 1991*) et sont au nombre d'environ 16000.

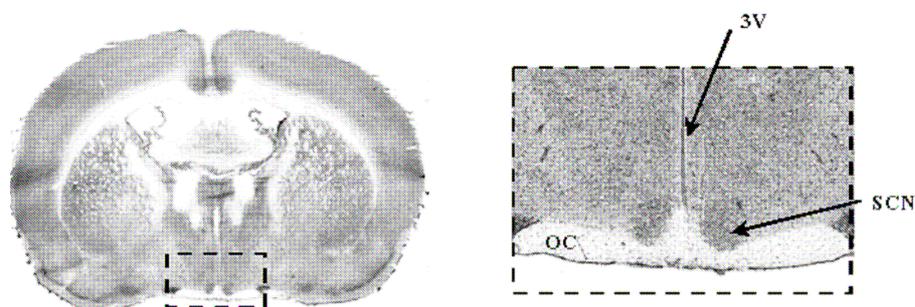


Figure 5 : *Localisation des SCN.*

A gauche est représentée la section coronale d'un cerveau de Hamster syrien au niveau des SCN marqués au violet de Crésyl. A droite se trouve un agrandissement de la région comprenant les SCN, adjacents au troisième ventricule (3V) et au-dessus du chiasma optique (OC).

b. Composition neurochimique des SCN

Les analyses cytochimiques réalisées sur différentes espèces de rongeurs nocturnes (Rat, Souris et Hamster syrien) ont permis de délimiter deux régions principales, **dorsomédiale** (ou **shell**) et **ventrolatérale** (ou **core** ; **Figure 6**). Évidemment, il s'agit d'une délimitation globale : d'une part, les SCN sont formés d'autres subdivisions et d'autre part, il existe nombre de petites différences interspécifiques (*Morin et al. 2006 ; Morin et Allen 2006*). Cette séparation en deux régions principales a été réalisée sur la base du contenu en neuropeptides des neurones qui les composent. La partie dorsomédiale est riche en neurones exprimant la **vasopressine** (AVP), alors qu'on trouve beaucoup de neurones exprimant le **peptide vasoactif intestinal** (VIP) au niveau de la zone ventrolatérale (*Inouye et Shibata 1994*). Il existe d'autres neuropeptides ayant une régionalisation plus ou moins marquée, comme le gastrin releasing peptide (GRP) qui est plutôt situé au niveau ventral, la somatostatine (SOM) qui est plutôt localisée au niveau central, la prokinétine 2 (PK2), la neurotensine, la thyrostimuline, la neuroméline S et la substance P (*Inouye et Shibata 1994 ; Masumoto et al. 2006 ; Mori et al. 2005 ; Piggins et al. 2001b ; Reuss 1996 ; Watts et Swanson 1987*). En plus de ces neuropeptides, deux neurotransmetteurs sont largement distribués dans les neurones des SCN, l'**acide γ -aminobutyrique** (GABA) et le **glutamate** qui sont respectivement inhibiteur et exciteur (*Okamura et al. 1989*). Enfin, d'autres molécules sont exprimées dans les SCN, comme la calbindine (protéine liant le Ca^{2+}), dont la distribution montre de grandes variations interspécifiques (*Silver et al. 1996b*).

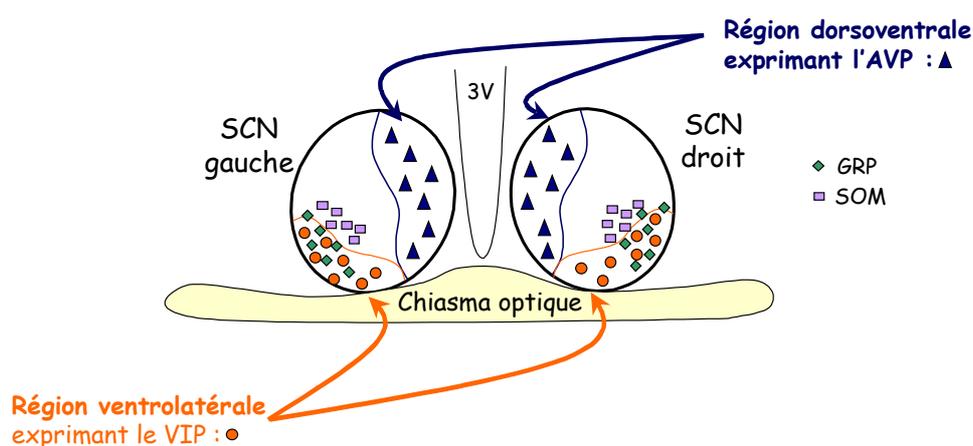


Figure 6 : Schéma simplifié de la subdivision et du contenu en neuropeptides des SCN. 3V : 3^{ème} ventricule ; AVP : vasopressine ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin-releasing peptide ; SOM : somatostatine.

L'étude de la distribution des deux principaux neuropeptides dans les SCN a également été réalisée chez plusieurs espèces de rongeurs diurnes, le Degu du Chili (*Goel et al. 1999*), le Rat du Nil (*Smale et Boverhof 1999*), l'Arvicanthis soudanais (*Dardente et al. 2004*), la Gerbille mongole (*Mikkelsen et Møller 1988*) et plusieurs espèces de Spermophiles (*Reuss 1989 ; Smale et al. 1991*). La même régionalisation pour le VIP et l'AVP a été retrouvée pour toutes ces espèces, sauf pour la Gerbille mongole où l'AVP serait plutôt située dans la région ventromédiale des SCN. Dans les SCN, une étude des neurones à calbindine, réalisée chez le Rat du Nil, a montré des différences mineures quant à leur localisation et leur nombre en comparaison avec ceux trouvés chez le Rat (*Mahoney et al. 2000*).

Il apparaît que la structure anatomique et la composition en neuropeptides des SCN n'apporte pas d'éléments essentiels pouvant expliquer ce qui différencie animaux diurnes et nocturnes.

4. Genèse des oscillations circadiennes

a. Découverte des gènes horloges

Alors que la localisation de l'horloge a été déterminée il y a plus de 35 ans, il a fallu attendre la fin des années 90 pour commencer à percevoir de quelle manière étaient engendrées les oscillations circadiennes chez les Mammifères, grâce à la découverte des **gènes horloges**. Après quelques années de travaux chez les rongeurs, un modèle d'autorégulation génique fut proposé (*Shearman et al. 2000b*) puis mis à jour plus récemment (*Ko et Takahashi 2006*). Dans ce concept, des éléments positifs permettent la transcription de gènes horloges. Ceux-ci après avoir été traduits, vont alors jouer le rôle d'éléments négatifs en inhibant les éléments positifs. Dans les SCN, les oscillations circadiennes, d'une période d'environ 24 h, sont donc dépendantes de deux boucles principales de rétroaction, l'une positive et l'autre négative (**Figure 7**).

L'implication des gènes horloges a été principalement mise en évidence par le biais des mutations. Par la suite, avant d'expliquer le rôle de chaque acteur, nous présenterons les données obtenues grâce à l'étude des mutants concernant les modifications de l'activité locomotrice induites par l'invalidation des différents gènes horloges.

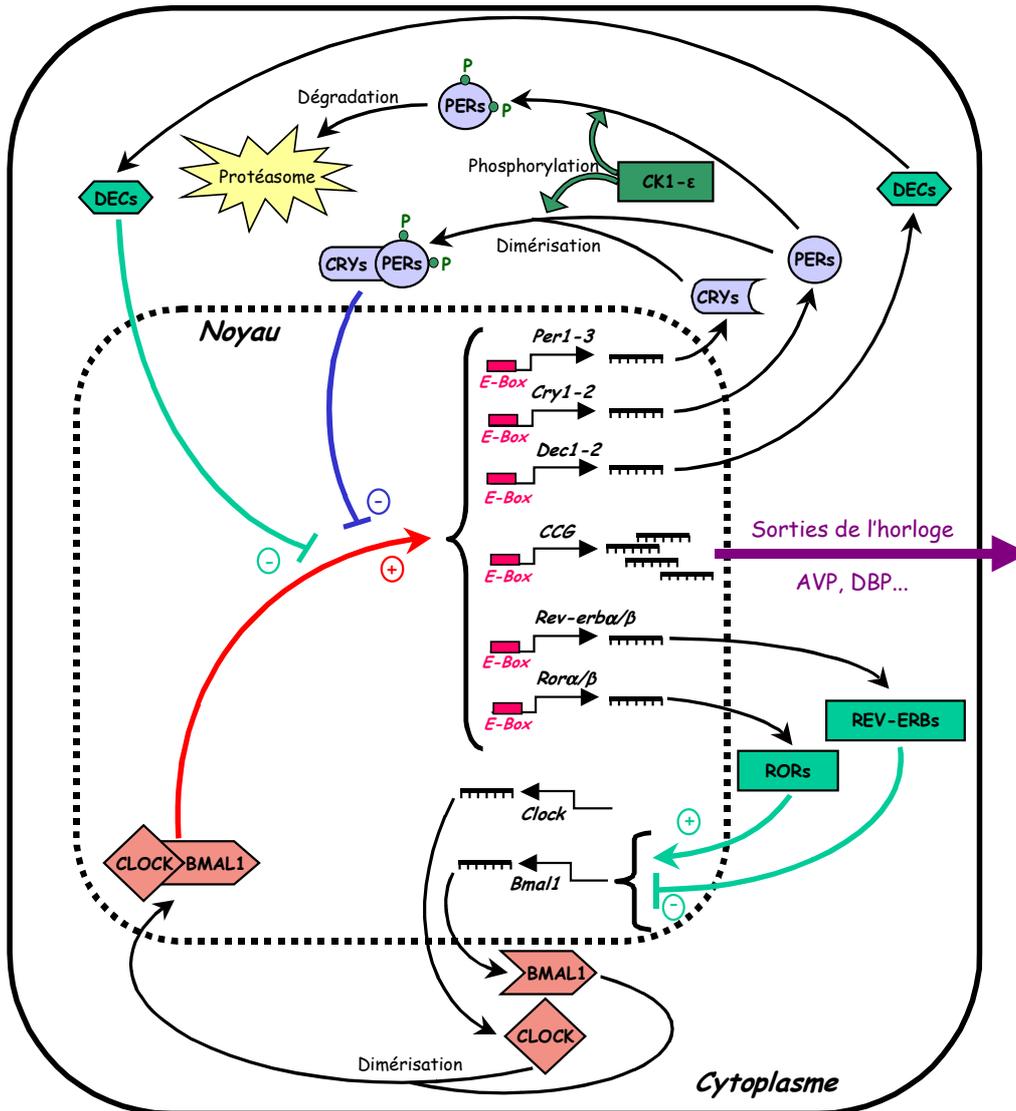


Figure 7 : Mécanismes moléculaires permettant la genèse d'oscillations circadiennes dans une cellule des SCN

Les gènes sont indiqués en italique et les protéines en MAJUSCULE. Les éléments de la boucle positive principale CLOCK/BMAL1 (en rouge) activent la transcription des gènes contenant une E_{BOX}. Parmi eux on trouve les éléments de la boucle négative principale PER/CRY (en bleu) qui une fois traduits en protéines vont inhiber leur propre transcription.

Les acteurs formant la boucle secondaire (REV-ERB et ROR, en vert) permettent une stabilisation des oscillations circadiennes via leur action sur *Bmal1*. CK1ε (en vert) phosphoryle PER, ce qui permet de contrôler de manière temporelle, du moins partiellement, l'interaction de PER avec CRY et la translocation nucléaire. DEC (en vert) a également un rôle inhibiteur sur la transcription des gènes contenant une E_{BOX}.

(D'après Ko et Takahashi 2006)

b. La boucle positive : CLOCK et BMAL1

Clock (circadian locomotor output cycles kaput) est le premier gène horloge à avoir été cloné chez les Mammifères (King *et al.* 1997) à partir de mutants obtenus en 1994 par mutagenèse chimique (Vitaterna *et al.* 1994). Les Souris mutantes pour *Clock* ont une période endogène plus longue que celles des Souris sauvages (~24 h), qu'elles soient hétérozygotes (~25 h) ou homozygotes (~27 h). De plus, les Souris homozygotes pour *Clock* deviennent **arythmiques** après quelques semaines d'obscurité constante, fournissant un argument en faveur de l'importance de ce gène dans la genèse des oscillations dans les SCN.

Bmal1 (brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) a été identifié pour la première fois en 1997 (Ikeda *et Nomura* 1997). Une autre équipe l'a également mis en évidence, sous le nom *Mop3*, l'année suivante (Hogenesch *et al.* 1998). Les Souris mutantes pour ce gène présentent une altération de la synchronisation en LD et deviennent **arythmiques** dès qu'elles sont placées en DD (Bunger *et al.* 2000). De plus, on constate chez ces Souris une diminution de l'activité générale.

Les protéines **CLOCK** et **BMAL1** qui sont des **facteurs de transcription** forment les éléments positifs de la boucle de rétroaction. Ces deux protéines possèdent chacune un site de liaison protéine-protéine nommé **PAS** (Per-ARNT-SIM) et peuvent donc former un **hétérodimère**. Ce dernier peut entrer dans le noyau de la cellule et se lier, grâce aux domaines **bHLH** (basic Helix-Loop-Helix), à une séquence **E_{BOX}** (CACGTG) du promoteur que possèdent plusieurs gènes. Cette liaison permet alors **l'activation de la transcription** des gènes de la boucle négative ainsi que des gènes contrôlés par l'horloge (CCG ; Gekakis *et al.* 1998 ; Hogenesch *et al.* 1998 ; **Figure 7**).

Les oscillations de ces deux gènes horloges ont été étudiées à la fois chez des animaux nocturnes (Rat, Souris et Hamster syrien ; Abe *et al.* 1999 ; Honma *et al.* 1998 ; Oishi *et al.* 2000 ; Tournier *et al.* 2003) et diurnes (Arvicanthis soudanais et Mouton ; Caldelas *et al.* 2003 ; Lincoln *et al.* 2002), en LD ou en DD selon le cas. **L'ARNm de *Bmal1*** est exprimé rythmiquement dans les SCN avec un **maximum d'expression en milieu de nuit (subjective)**. Des données, obtenues uniquement chez les animaux nocturnes, montrent que la **protéine BMAL1** oscillerait dans les SCN avec un pic en **fin de nuit** (Tamaru *et al.* 2000) ou en **début de jour** (Maywood *et al.* 2003). Dans les SCN, les niveaux de **l'ARNm de *Clock*** et de sa **protéine** ne présentent **pas d'oscillations** chez les animaux nocturnes (Maywood *et al.* 2003 ; Shearman *et al.* 1999 ; Tournier *et al.* 2003), sauf chez le Hamster syrien placé en

photopériode courte. Chez le Mouton par contre (*Lincoln et al. 2002*), l'ARNm de *Clock* est rythmique avec un **maximum observé à la transition jour-nuit**.

c. La boucle négative : PER et CRY

Les gènes *Per* (period) ont été identifiés par homologie de séquence avec le gène du même nom cloné chez la drosophile (*Reddy et al. 1984*). Ils sont au nombre de trois, *Per1*, *Per2* et *Per3* (*Shearman et al. 1997 ; Sun et al. 1997 ; Zylka et al. 1998*). La période circadienne des mutants *Per1* homozygotes est plus courte et moins stable (~22.6 h), que celle des Souris sauvages (~23.7 h). Cependant ils restent **rythmiques** en DD (*Cermakian et al. 2001 ; Zheng et al. 2001*). Quant aux mutants *Per2*, leur période endogène est encore plus courte (~22.1 h) et ils deviennent **arythmiques dans un délai de 2 à 18 jours** une fois en DD (*Bae et al. 2001 ; Zheng et al. 1999*). L'inactivation de *Per3* n'a par contre aucun effet visible d'un point de vue comportemental (*Shearman et al. 2000a*). Les doubles mutants *Per1/Per2* sont immédiatement **arythmiques** en DD (*Zheng et al. 2001*), alors que les mutants *Per1/Per3* ou *Per2/Per3* présentent le même type d'altération que les Souris mutantes pour *Per1* ou *Per2* (*Bae et al. 2001*).

Les gènes *Cry* (cryptochrome) sont au nombre de deux, *Cry1* et *Cry2*. D'abord considérés comme des photorécepteurs impliqués dans la synchronisation photique (*Miyamoto et Sancar 1998*), ils ont rapidement révélé leur rôle d'acteurs dans les oscillations circadiennes (*Kume et al. 1999 ; Okamura et al. 1999 ; Van der Horst et al. 1999*). L'inactivation des gènes *Cry1* et *Cry2* provoque respectivement un raccourcissement (~22.5 h) et un allongement (~24.6 h) de la période d'activité locomotrice quand les animaux sont placés en DD (*Van der Horst et al. 1999 ; Vitaterna et al. 1999*). Par contre, les doubles mutants *Cry1/Cry2* sont immédiatement **arythmiques** lorsqu'ils sont soumis aux conditions d'obscurité constante (*Van der Horst et al. 1999*).

Des expériences ont également été menées sur des mutants pour un ou plusieurs des gènes *Per* et un ou plusieurs des gènes *Cry* (*Oster et al. 2002 ; 2003a ; 2003b*) :

- Les Souris doubles mutants *Per1/Cry1* sont **rythmiques** en DD avec une période endogène proche de celles des Souris sauvages. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés pour les mutants *Per1* ou *Cry1*.
- Les doubles mutants *Per1/Cry2* présentent une rythmicité perturbée en LD et deviennent **arythmiques** en DD à partir de l'âge de 6 à 12 mois.
- Les doubles mutants *Per2/Cry1* sont immédiatement **arythmiques** quand ils sont placés en DD.

- De manière surprenante, les doubles mutants *Per2/Cry2* présentent une restauration de la rythmicité au niveau comportemental et moléculaire. Les animaux sont donc **rythmiques** en DD alors que les mutants pour *Per2* ne le sont pas.
- Les différentes combinaisons de triples mutants *Per* et *Cry* sont tous **arythmiques** en DD ce qui signifie **qu'un seul des gènes *Per* ou *Cry* est insuffisant pour assurer la rythmicité circadienne au sein des SCN.**

Les protéines **PER** et **CRY** dont la production est activée par l'hétérodimère CLOCK/BMAL1 forment les facteurs négatifs de la boucle de rétroaction. Ces deux types d'éléments peuvent former **plusieurs hétérodimères PER/CRY** différents en se liant via leur **domaine PAS**. Ces complexes pénètrent dans le noyau des cellules et interagissent avec CLOCK/BMAL1, ce qui **bloque la transcription des gènes contenant une E_{BOX}** et a donc une **action inhibitrice** sur leur propre transcription (*Bae et al. 2000 ; Lee et al. 1999 ; Figure 7*). De plus, comme nous le verrons par la suite, PER/CRY a également une **action activatrice** sur la transcription de **BMAL1 via l'inhibition de la transcription** d'un des gènes des boucles secondaires, *Rev-erba* (*Preitner et al. 2002*).

Dans les SCN des espèces nocturnes (Rat, Souris et Hamster syrien) et diurnes (Spermophile, Rat du Nil, Arvicanthis soudanais et Mouton), les oscillations des niveaux d'ARNm des différents gènes *Per* et *Cry* sont **similaires** (*Albrecht et al. 1997 ; Caldelas et al. 2003 ; Horikawa et al. 2000 ; Kume et al. 1999 ; Lambert et al. 2005 ; Lincoln et al. 2002 ; Mrosovsky et al. 2001 ; Novak et al. 2006 ; Okamura et al. 1999 ; Shearman et al. 1997 ; Sun et al. 1997 ; Tournier et al. 2003 ; Yan et al. 1999*). L'ARNm de *Per1* présente des valeurs maximales **en début ou en milieu de jour (subjectif)**. L'ARNm de *Per2* est à son niveau maximum en **toute fin de jour (subjectif)** comme ceux de *Cry1*. Pour *Cry2*, alors que certains travaux démontrent que son ARNm a des **valeurs maximales en début de nuit (subjective)** chez les rongeurs nocturnes (*Okamura et al. 1999*) et diurnes (*Caldelas et al. 2003*), d'autres on relevé une absence de rythmicité chez les espèces nocturnes (*Kume et al. 1999*).

Il existe un certain nombre de travaux concernant les protéines PER et CRY chez les animaux nocturnes. Par contre, les données obtenues chez les rongeurs diurnes sont très peu nombreuses, seules deux études portant sur le niveau des protéines **PER1** et **PER2** dans les SCN ont été publiées (*Mendoza et al. 2007 ; Ramanathan et al. 2006*). Les niveaux d'expression de ces deux protéines atteignent leur maximum en **début de nuit**, comme ceux des rongeurs nocturnes (*Field et al. 2000 ; Nuesslein-Hildesheim et al. 2000 ; Sumova et al. 2002 ; Tamaru et al. 2000*). Les niveaux maximaux d'expression de **CRY1** et de **CRY2** chez

les espèces nocturnes ont lieu en **toute fin de jour** et pendant la **première moitié de la nuit** (Kume et al. 1999 ; Miyamoto et Sancar 1998 ; 1999).

Malgré le nombre réduit de résultats obtenus chez les espèces diurnes, il apparaît que les mécanismes permettant la genèse des oscillations circadiennes dans les SCN sont similaires entre animaux diurnes et nocturnes.

d. Les boucles secondaires : REV-ERB et ROR

En 2002, un nouvel acteur circadien du nom de **Rev-erba** (également appelé *NR1D1*) a été identifié (Preitner et al. 2002). Il s'agit d'un **facteur de transcription** qui fait partie de la famille des « récepteurs orphelins nucléaires » et qui se lie sur des séquences d'ADN nommées **RORE** (retinoic acid related orphan receptors response element).

Chez les Souris dont le gène *Rev-erba* a été invalidé, **BMAL1 est surexprimé** de manière **constitutive** dans les SCN. Par contre, l'expression de *Per2* et celle de *Cry2* restent quasiment similaires à celles des Souris sauvages, ce qui peut expliquer le **maintien de la rythmicité** en DD avec toutefois, une période d'activité locomotrice plus courte. Par conséquent, **REV-ERB α** est un facteur régulant **négativement** l'expression de *Bmal1*, lui conférant ainsi un rythme d'expression (**Figure 7**). Autrement dit, REV-ERB α servirait de lien entre les boucles positive et négative.

L'expression de **l'ARNm de Rev-erba** oscille dans les SCN, avec un pic en **début de jour subjectif** chez les espèces nocturnes (Preitner et al. 2002 ; Onishi et al. 2002 ; Ueda et al. 2002) et en **milieu de jour subjectif** chez l'Arvicanthis soudanais (Mendoza et al. 2007).

Il existe également un gène **Rev-erb β** (*NR1D2*), dont la protéine est capable **d'inhiber** la transcription de *Bmal1* (Guillaumond et al. 2005). Son action est donc redondante de celle de *Rev-erba* (Liu et al. 2008). Dans les SCN, son niveau d'expression est **maximum en milieu de jour subjectif** (Guillaumond et al. 2005 ; Preitner et al. 2002).

Une autre famille de « récepteurs orphelins nucléaires », se liant également sur les séquences RORE, est impliquée dans la régulation de BMAL1 : il s'agit de la famille des gènes **Ror** (Sato et al. 2004b). On en dénombre trois, *Rora*, *Ror β* et *Rory*.

Les Souris knock-out pour le gène **Rora** ou les mutants dits « staggerer » présentent une ataxie cérébelleuse. Malgré cela, les enregistrements d'activité locomotrice montrent que ces Souris restent **rythmiques** en DD avec une **période endogène plus courte** que celle des Souris sauvages. De plus, **l'expression de Bmal1 est sérieusement réduite** (Sato et al. 2004b ; Steinmayr et al. 1998). Les Souris mutantes pour le gène **Ror β** ou « vascillans » sont de petite taille, aveugles et ont un faible tonus musculaire. Elles restent **rythmiques** en DD

avec une **période endogène plus longue** que celle des Souris sauvages (*André et al. 1998*). Quant aux mutants *Rory*, ils présentent notamment un développement anormal des organes lymphoïdes. Ils restent également **rythmiques** en DD avec une **période endogène similaire** à celle des Souris sauvages (*Liu et al. 2008*).

Rora (*NR1F1*) est exprimé **ubiquitairement** dans l'organisme (*Akashi et Takumi 2005*). La diminution d'expression de **BMAL1** chez les Souris mutantes pour ce gène suggère qu'il a un **rôle activateur** sur la transcription de *Bmal1* (*Sato et al. 2004b* ; **Figure 7**). De plus, la transcription de *Rora* serait activée par le dimère CLOCK/BMAL1 via une E_{BOX}. Concernant son expression rythmique dans les SCN, les seules données obtenues proviennent d'une espèce nocturne, la Souris, chez laquelle on trouve des **valeurs maximales en fin de jour subjectif** (*Ueda et al. 2002*).

Rorb (*NR1F2*) est exprimé uniquement dans le cerveau et particulièrement dans les SCN de manière rythmique avec un **maximum en milieu de jour subjectif** (*Sumi et al. 2002*). Son rôle serait redondant de celui de *Rora* (*Ko et Takahashi, 2006*).

Rory (*NR1F3*) n'est exprimé que dans les tissus périphériques et interviendrait dans les oscillations circadiennes pour réguler l'amplitude de BMAL1 (*Guillaumond et al. 2005* ; *Liu et al. 2008*).

Il apparaît que les différentes protéines REV-ERB et ROR modulent la transcription de BMAL1, mais ne sont pas indispensables à la genèse de la rythmicité circadienne dans les SCN (*Liu et al. 2008*). Ces protéines auraient plutôt un **rôle stabilisateur** en maintenant notamment de **fortes amplitudes** des oscillations des gènes horloges, assurant ainsi une meilleure réponse aux stimuli synchroniseurs que nous aborderons ultérieurement (voir V.). De plus ces protéines réguleraient également la transcription des CCG.

e. Les autres acteurs

Hormis les acteurs principaux et secondaires évoqués ci-dessus, il existe encore d'autres molécules qui interviennent dans la régulation des oscillations circadiennes aux niveaux pré- et post-traductionnels.

DEC1 (differentiated embryo chondrocyte protein) et **DEC2** sont des **facteurs de transcription** à domaines bHLH et PAS. Leurs ARNm sont exprimés rythmiquement dans les SCN avec un **maximum en début de jour subjectif** et le phénotype des Souris mutantes pour ces deux gènes ne semble **pas altéré** (*Grechez-Cassiau et al. 2004* ; *Honma et al. 2002*). Les protéines DEC **inhiberaient la transcription des gènes contrôlés par**

CLOCK/BMAL1, soit par une interaction directe avec ce dimère, soit indirectement *via* une compétition au niveau des E_{BOX} (Hamaguchi et al. 2004 ; Sato et al. 2004a ; **Figure 7**).

CKIε (Caséine Kinase Iε) et **CKIδ** sont deux protéines interagissant avec les monomères PER1 et PER2 (Lowrey et al. 2000 ; Takano et al. 2000 ; Vielhaber et al. 2000). Ces deux enzymes agissent au niveau post-traductionnel en **phosphorylant PER1 et PER2**, ce qui conduit à la dégradation de ces derniers, ainsi qu'à une rétention cytoplasmique ou à une facilitation de leur entrée dans le noyau selon le cas. PER1 et PER2 ne pourraient pas s'accumuler dans le cytoplasme tant que les niveaux de ces deux protéines ne sont pas suffisamment élevés pour dépasser la capacité de phosphorylation des caséine kinases (Okamura et al. 2002). A titre d'exemple, la mutation tau, énoncée précédemment et découverte chez le Hamster syrien, s'est révélée être une mutation du gène codant pour CKIε (Lowrey et al. 2000). Cette protéine mutée ne jouerait plus son rôle de phosphorylation, ce qui provoquerait une forte accumulation cytoplasmique de PER qui entrerait alors plus tôt dans le noyau, entraînant ainsi une période endogène plus courte.

5. La rythmicité circadienne au sein des SCN

Le message rythmique élaboré dans les SCN *via* les oscillations des gènes horloges va ensuite être distribué au reste de l'organisme. Au sein même des SCN, on constate la rythmicité de nombreux paramètres comme l'utilisation de glucose, l'activité électrique des neurones, ainsi que la synthèse des ARNm et des protéines codant pour certains neuropeptides, et autres molécules.

a. Activité métabolique

L'activité métabolique a été le premier paramètre montrant que les SCN fonctionnent de manière rythmique (Schwartz et Gainer 1977). La méthode du 2-désoxyglucose radioactif a permis de révéler qu'il existait un **rythme de consommation de glucose** chez le Rat présentant un **maximum durant le jour**. Quelques années plus tard, avec la même méthode, Schwartz et coll. mirent en évidence que la phase du rythme de consommation de glucose est **similaire** chez le Rat et deux espèces diurnes, le Chat (*Felis silvestris*) et le Singe écureuil (*Saimiri sciureus* ; Schwartz et al. 1983). Une autre étude démontre la présence d'un rythme similaire à celui du Rat pour le Hamster syrien, mais une absence de rythmicité chez le Spermophile à treize bandes, une autre espèce diurne (Flood et Gibbs 1982).

b. Activité électrique

La démonstration de la rythmicité circadienne de l'activité électrique a été réalisée chez les espèces nocturnes *via* des enregistrements unitaires et multi-unitaires, en condition *in vivo* (Meijer *et al.* 1997), *in vitro* sur tranches hypothalamiques (Prosser et Gillette 1989), sur cultures organotypiques (Belenky *et al.* 1996) ou sur culture de cellules dissociées (Welsh *et al.* 1995). Plusieurs informations ressortent de ces études. Premièrement, les enregistrements *in vitro* mettent en avant la capacité des neurones suprachiasmatiques de produire et **d'auto-entretenir** des oscillations circadiennes. Ainsi, chaque neurone peut être considéré comme une **cellule-horloge autonome** (Welsh *et al.* 1995). Deuxièmement, les enregistrements multi-unitaires ont permis d'établir la présence d'un **rythme de décharge spontané des neurones** avec un **maximum pendant le jour** chez un rongeur nocturne, le Rat (Meijer *et al.* 1997), mais également chez un rongeur diurne de la Famille des Spermophiles (*Eutamias Sibiricus* ; Sato et Kawamura 1984). Ce rythme est considéré comme une **sortie de l'horloge**, car il disparaît en présence de tétrotoxine (TTX, bloqueur des canaux Na⁺). Toutefois quand cette toxine est retirée, ce rythme réapparaît à la phase extrapolée avant l'arrêt de la manifestation rythmique dû à la TTX (Schwartz *et al.* 1987). La rythmicité électrique ne participe donc pas à la genèse des oscillations, mais est sous contrôle des gènes horloges. Cette corrélation n'est pas encore clairement établie, cependant, les gènes *Cry1*, *Cry2* et *Per1* seraient impliqués (Albus *et al.* 2002 ; Quintero *et al.* 2003).

c. Les gènes contrôlés par l'horloge (CCG)

Les gènes contrôlés par l'horloge sont des gènes exprimés dans les SCN, dont la transcription est activée, directement ou indirectement, par CLOCK/BMAL1. Ils ne sont néanmoins pas impliqués dans la genèse des oscillations, mais plutôt dans la transmission de la rythmicité.

Le gène codant pour l'**AVP** fait partie des CCG. Il possède une E_{BOX} (Jin *et al.* 1999) et son expression est donc régulée de manière circadienne avec un **pic ayant lieu en milieu de jour en LD et en DD** chez les rongeurs nocturnes et diurnes (Dardente *et al.* 2004 ; Jin *et al.* 1999 ; Uhl et Reppert 1986). Cependant, le rôle circadien de l'AVP reste méconnu. Il serait notamment impliqué dans la **régulation circadienne de la prise hydrique**, car une élimination sélective des neurones à AVP abolit ce rythme (Van Esseveldt *et al.* 2000). De manière surprenante, chez les doubles mutants *Per1/Per2* qui sont arythmiques, le rythme d'AVP dans les SCN subsiste avec un maximum en milieu de jour, comme chez les animaux sauvages (Van der Veen *et al.* 2008).

Le **DBP** (albumin D-element binding protein) est un autre gène possédant une E_{BOX} (Ripperger et al. 2000). D'abord identifié dans les tissus périphériques, il a ensuite été mis en évidence comme rythmique dans les SCN avec un pic survenant en milieu de jour chez la Souris (Lopez-Molina et al. 1997). DBP est un facteur de transcription appartenant à la même famille que FOS et JUN (Mueller et al. 1990). Le rôle circadien de cette protéine reste toutefois à déterminer.

d. Le cas du VIP

L'étude des oscillations du gène codant pour le **VIP** au sein des SCN a conduit à des résultats controversés. En effet, chez le Rat, on trouve un **rythme journalier en LD** avec un pic survenant **pendant la nuit**. Cependant, ce **rythme disparaît en DD** et l'expression du VIP est alors constitutive (Takahashi et al. 1989 ; Van Esseveldt et al. 2000). Chez le Hamster syrien, l'expression du VIP n'est pas rythmique, même en LD (Duncan et al. 2001). Le VIP ne serait donc nécessaire ni à la génération des oscillations dans les SCN, ni à la transmission du message rythmique hors des SCN. Néanmoins, la situation est différente chez la Souris et l'Arvicanthis soudanais, un rongeur diurne (Dardente et al. 2004). En **LD**, il existe un rythme d'expression de l'ARNm de **faible amplitude** présentant un **maximum en début de nuit** pour les deux espèces. En **DD**, ce **rythme persiste** avec la même phase, mais avec une forte amplitude chez la Souris et une faible amplitude chez l'Arvicanthis soudanais. Chez ces deux espèces, le VIP pourrait donc peut-être agir comme un CCG. Une étude réalisée chez des Souris mutantes pour le récepteur du VIP (VIPR) met en évidence une arythmicité de leur activité locomotrice (Maywood et al. 2006). Cependant, en étudiant individuellement les neurones des SCN, les auteurs ont remarqué qu'ils demeureraient rythmiques. Le **VIP serait donc indispensable à la synchronisation des neurones suprachiasmatiques entre eux**.

e. Les autres peptides

Il existe un certain nombre de peptides dont l'expression est rythmique au sein des SCN, mais nous ne dresserons pas ici une liste exhaustive de ceux-ci.

La rythmicité circadienne du **TGF α** (transforming growth factor α) a été mise en évidence dans les SCN du Hamster syrien et de la Souris (Kramer et al. 2001 ; Tournier et al. 2007). Son ARNm présente des **valeurs maximales durant le jour**. De plus, une **infusion de TGF α** dans le troisième ventricule **inhibe l'activité locomotrice** de manière réversible. Cet effet passerait par le récepteur du TGF α , car des Souris mutantes pour ce récepteur présentent une activité diurne anormalement élevée. **Ce peptide serait donc responsable de l'inhibition**

diurne de l'activité locomotrice. Cependant, une étude menée chez un rongeur diurne, l'Arvicanthis soudanais, va à l'encontre de cette hypothèse (Tournier et al. 2007). En effet, les **valeurs maximales** du rythme d'expression de ce gène surviennent **pendant le jour en DD**, comme pour la Souris et le Hamster syrien, alors qu'en **LD**, son expression est **élevée et constitutive**. De plus, un créneau de lumière, appliqué pendant le jour chez ces animaux placés en DD, a un effet activateur sur l'expression de TGF α . **Ce peptide ne serait donc pas responsable de la régulation de l'activité locomotrice chez cette espèce diurne.**

La PK2 aurait le même effet que le TGF α . Elle est présente dans les SCN de manière rythmique avec un maximum en début de jour chez la Souris et une espèce diurne, le Rat du Nil (Cheng et al. 2002 ; Lambert et al. 2005). De plus la présence des récepteurs à la PK2 (rPK2) a été démontrée dans les SCN de ces deux espèces (Lambert et al. 2005 ; Masumoto et al. 2006). Une infusion de PK2 durant la nuit subjective inhibe l'activité locomotrice (Cheng et al. 2002), ce qui suggère une régulation de l'activité locomotrice. Les effets d'une telle infusion restent néanmoins à étudier chez une espèce diurne.

La majorité des résultats obtenus concernant les SCN et leur fonctionnement rythmique sont similaires entre espèces nocturnes et diurnes. Ceci suggère que les mécanismes qui régulent ces caractères sont situés en aval de l'horloge circadienne principale.

IV. Sorties de l'horloge circadienne principale

1. La distribution du message circadien

Les signaux circadiens générés par les SCN sont transmis au reste de l'organisme par deux voies majeures. La première est la **voie neuronale** qui utilise la transmission synaptique. La seconde utilise la **voie humorale** via la sécrétion paracrines de molécules, qui diffusent dans le liquide céphalo-rachidien et/ou les vaisseaux sanguins cérébraux. Par le biais de ces voies, les SCN sont capables de réguler notamment l'activité locomotrice (voir I.) et le taux de certaines hormones, comme la mélatonine ou la corticostérone. Après avoir mis en évidence les différentes voies de transmission du signal circadien, nous étudierons quelques exemples de sorties régulées par les SCN, mais nous nous limiterons aux données obtenues à la fois chez des animaux diurnes et nocturnes.

De manière surprenante, le champ des projections des neurones suprachiasmatiques est assez restreint et se limite essentiellement à des structures de l'hypothalamus. Ces connexions

nerveuses ont été mises en évidence par l'utilisation d'immunomarquages pour l'AVP et le VIP ainsi que par des techniques de lésion ou de marquage (Van Esseveldt et al. 2000 ; **Figure 8**).

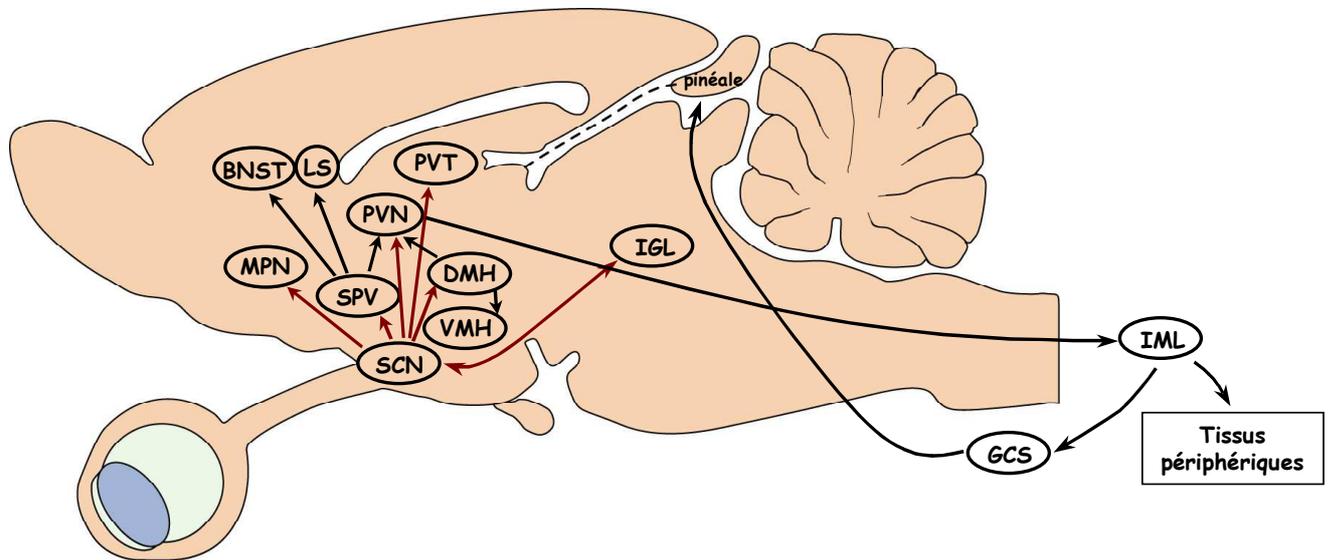


Figure 8 : Réseau neuranatomique des efférences des SCN

Les structures sont innervées par les SCN de manière directe (flèches rouges) ou indirecte (flèches noires). BNST : noyau du lit de la strie terminale ; DMH : noyau dorsomédial de l'hypothalamus ; GCS : ganglion cervical supérieur ; IGL : feuillet intergénéral latéral ; IML : colonne intermédiolatérale ; MPN : aire préoptique médiane ; PVN : noyau paraventriculaire hypothalamique ; PVT : noyau paraventriculaire thalamique ; LS : septum latéral ; SCN : noyau suprachiasmatique ; SPV : zone subparaventriculaire ; VMH : noyau ventromédial de l'hypothalamus.

(D'après Kalsbeek et Buijs 2002)

Chez les rongeurs, les projections les plus importantes aboutissent dans la **zone subparaventriculaire (SPV)** et dans les **noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN)**. La zone SPV innerve à son tour de multiples structures, comme le septum, le thalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière (Watts et Swanson 1987). La zone SPV jouerait un rôle **d'amplificateur** pour les SCN. Les neurones suprachiasmatiques projettent également, mais de manière moins importante, vers les noyaux paraventriculaires thalamiques (PVT), les noyaux dorsomédiaux de l'hypothalamus (DMH), les noyaux préoptiques médiaux (MPN) et les feuillets intergénéralés latéraux (IGL).

L'analyse morphofonctionnelle des neurones dorsomédiaux à AVP qui transmettent une information rythmique (voir III. 5. c.), indique qu'ils projettent à la fois vers les structures cibles des SCN (Buijs et Kalsbeek 2001), mais aussi vers les neurones ventraux à VIP des

SCN (Jacomy *et al.* 1999). Certains de ces neurones à VIP envoient des projections en direction des PVT (Teclerian-Mesbah *et al.* 1997).

Les neurones à GABA et à glutamate jouent également un rôle important dans la transmission des signaux quittant l'horloge circadienne principale (Hermes *et al.* 1996 ; Kalsbeek *et al.* 1999). Les SCN *via* ces neurones projettent vers les PVN, d'une part, dans la région neuroendocrine (magnocellulaire) qui participe au contrôle temporel des sécrétions hormonales et d'autre part, dans la région régulant le système autonome (parvocellulaire ; Buijs *et Kalsbeek* 2001). À partir des PVN, une autre voie, très étudiée, que nous aborderons par la suite (voir IV. 2.), se dirige vers la glande pinéale de manière poly-synaptique (Perreau-Lenz *et al.* 2003).

La diffusion de molécules par les SCN, permettant la transmission d'une information rythmique à d'autres structures, a été mise en évidence par la technique des greffes de SCN. En effet, dans la majorité des cas, la croissance des fibres nerveuses après la greffe n'est pas observée, alors que ces greffes permettent la restauration de la rythmicité circadienne (Griffioen *et al.* 1993 ; Ralph *et Hurd* 1995 ; Silver *et al.* 1996a). C'est avec cette technique, doublée d'un encapsulement du greffon dans une membrane semi-perméable, qu'ont pu être découverts certains de ces signaux diffusibles (Silver *et al.* 1996a). Parmi ces facteurs, on peut citer le **TGF α** et la **PK2**, dont nous avons déjà évoqué les rôles (voir III. 5. e.).

2. Horloge, glande pinéale et mélatonine

La **mélatonine** est une hormone synthétisée par la **glande pinéale** (ou épiphyse) et libérée dans la circulation générale pendant la **nuit**. Son rôle est essentiellement de **contrôler les fonctions saisonnières**, comme la reproduction ou l'hibernation. Le rythme de mélatonine présente des valeurs maximales durant la nuit, à la fois chez les espèces nocturnes et diurnes (Garidou *et al.* 2002 ; Vivanco *et al.* 2007). L'horloge circadienne principale contrôle la sécrétion de mélatonine de manière circadienne *via* une voie nerveuse bien caractérisée (Larsen *et al.* 1999 ; Teclerian-Mesbah *et al.* 1999 ; **Figure 8**). À partir des SCN, cette voie se dirige vers les PVN, puis vers la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (IML) et le ganglion cervical supérieur (GCS), pour finir dans la glande pinéale. Le contrôle de la synthèse de mélatonine se fait par une enzyme limitante, **l'arylalkylamine N-acétyltransférase** (AA-NAT). Les rythmes du niveau d'ARNm de cette enzyme, ainsi que celui de mélatonine sont abolis par une lésion de l'une des structures sus-mentionnées, ce qui confirme leur implication dans la voie SCN-glande pinéale (Garidou *et al.* 2001 ; Kalsbeek *et al.* 2000). D'une manière générale, le début de la nuit marque l'activation de la voie SCN-

glande pinéale qui se caractérise par **la libération de noradrénaline** (NA). Chez les animaux nocturnes, comme le Rat (*Roseboom et Klein 1995*), la Souris (*Foulkes et al. 1996*) et le Hamster syrien (*Gauer et al. 1999*), ainsi que pour l'Arvicanthis soudanais, un rongeur diurne (*Garidou et al. 2002*), la synthèse de l'AA-NAT passe par une **stimulation transcriptionnelle** (impliquant l'AMPC et CREB ou Ca²⁺/cAMP-responsive element binding protein) et une **inhibition de la protéolyse**. Ces deux phénomènes sont médiés par l'activation des récepteurs noradrénergiques situés sur les pinéocytes. L'inhibition de la synthèse de l'AA-NAT est **identique** entre les rongeurs nocturnes et l'Arvicanthis soudanais: lorsque l'information photique est captée par les SCN, il y a arrêt de la libération de NA dans la glande pinéale. La transcription de l'AA-NAT s'arrête et l'inhibition de la protéolyse est levée, ce qui permet une **dégradation rapide** de la protéine AA-NAT encore présente. S'il n'y a pas de différence entre rongeurs diurnes ou nocturnes concernant ce processus, il existe par contre des différences pour d'autres Ordres de Mammifères, notamment les Ongulés (*Coon et al. 1995*) et les Primates (*Klein et al. 1997*). Chez ces espèces diurnes, la régulation de l'AA-NAT se fait de manière **post-transcriptionnelle**: la synthèse de la protéine AA-NAT est constante, mais pendant le jour elle est dégradée par les protéasomes, alors que la nuit, l'activation des récepteurs noradrénergiques permet l'inhibition de cette protéolyse. **Ces résultats permettent de dire que ces différences ne sont pas dues au caractère diurne ou nocturne, mais plutôt à l'origine phylogénétique des espèces étudiées.**

3. Horloge, glandes surrénales et corticostérone

Chez les Mammifères, les **glucocorticoïdes** ont de nombreuses fonctions: ils régulent les taux de glucose, interviennent dans le métabolisme des protéines et acides gras, ont un rôle anti-inflammatoire et immunosuppresseur, et agissent sur l'humeur et les fonctions cognitives. Chez le Rat (*Kalsbeek et al. 1996 ; 1998*), les SCN sont capables de contrôler la synthèse rythmique de glucocorticoïdes par les glandes surrénales *via* une libération d'AVP dans les PVN. Ce contrôle permet notamment la libération de CRH (corticotropin-releasing hormone) par les neurones des PVN. Cette libération se fait dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, ce qui induit la synthèse puis la libération d'ACTH (adreno-corticotropin hormone) dans la circulation générale. L'ACTH va ensuite pouvoir *via* son action sur les glandes surrénales, stimuler la synthèse et la libération de **corticostérone** chez le Rat ou de **cortisol** chez l'Homme et le Hamster syrien. En plus du contrôle humoral de la sécrétion de glucocorticoïdes *via* l'ACTH, il existe un contrôle nerveux de cette sécrétion par le système

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

Chez le Rat (*De Boer et Van der Gugten 1987, Kalsbeek et al. 1998*), il existe un **rythme de corticostérone** plasmatique avec un **maximum situé en fin de jour**, peu de temps avant le début de la phase d'éveil. Il est admis que ce pic permet à l'animal de se préparer à la période pendant laquelle il va être actif, en mobilisant les sources d'énergie et en stimulant le comportement de recherche alimentaire. Chez les animaux diurnes, on retrouve un rythme de libération de **corticostérone** avec un **maximum survenant en fin de nuit**, peu avant l'éveil (*Pal 1979 ; Zolovick et al. 1966*). Ce pic survient donc en **anti-phase** par rapport à ce que l'on trouve chez les animaux nocturnes, ce qui met en évidence une différence entre espèces diurnes et nocturnes. Chez l'Arvicanthis soudanais, une autre espèce diurne (*Verhagen et al. 2004*), il existe en plus du pic survenant en fin de nuit, un autre pic en fin de jour. Lorsque les mesures de corticostérone plasmatique ont été réalisées, les animaux avaient accès à une roue et leur activité était bimodale. Ceci pourrait être en rapport avec le rythme de corticostérone qui est également bimodal sachant que ces deux paramètres sont étroitement liés. Le premier pic anticipe de quelques heures le réveil de l'animal (comme c'est le cas pour les espèces nocturnes et les autres espèces diurnes étudiées), alors que le deuxième pic a lieu lorsque l'animal a déjà repris son activité dans la roue. Il est donc difficile d'interpréter l'origine de ce deuxième pic et de savoir s'il est régulé de manière circadienne. Mais les résultats trouvés pour ce rongeur, comme pour les autres espèces diurnes, diffèrent de ceux observés chez les animaux nocturnes. Cette différence pourrait s'expliquer par l'inversion de la phase du cycle veille-sommeil entre animaux diurnes et nocturnes. Des données mettent en avant le fait que la corticostérone contrôlerait *via* une action sur les noyaux du raphé, la libération rythmique de sérotonine (5-HT) endogène dans les SCN (*Malek et al. 2007*). Puisque l'activité des neurones à 5-HT est corrélée au niveau d'éveil (*Jacobs et Fornal 1999*), **la corticostérone pourrait donc participer aux mécanismes régulant le maintien du caractère nocturne ou diurne.**

4. Les structures cérébrales impliquées dans le cycle veille-sommeil

Le sommeil est un phénomène complexe impliquant de nombreuses structures cérébrales. Certaines d'entre elles reçoivent plus ou moins directement des messages circadiens provenant des SCN (*Saper et al. 2005 ; Figure 9*).

Il existe notamment à partir des SCN, une voie qui innerve les DMH de manière directe ou indirecte *via* la zone SPV. Les DMH projettent à leur tour en direction des aires préoptiques ventrolatérales (VLPO) qui sont impliquées entre autre dans l'initiation et le maintien du sommeil à ondes lentes. Les DMH envoient également des projections en direction des aires hypothalamiques latérales (LHA) qui ont notamment un rôle dans le phénomène d'éveil. Les VLPO induiraient le sommeil en inhibant les régions monoaminergiques du cerveau impliquées dans l'éveil via des neurones à GABA et galanine. Parmi ces structures, on compte les noyaux tubéromammillaires ventraux (vTM) qui projettent également en direction des SCN.

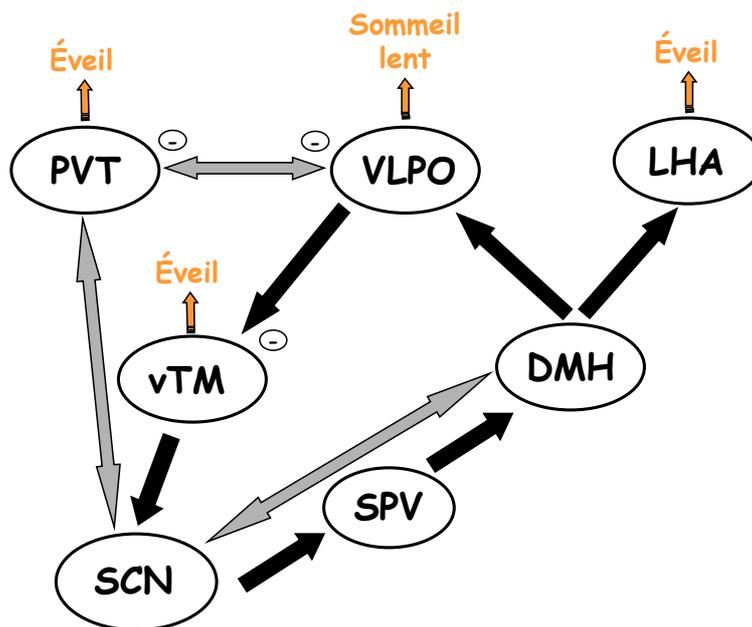


Figure 9 : Schéma des structures en relation avec les SCN et impliquées dans l'éveil ou le sommeil

DMH : noyau dorsomédial de l'hypothalamus ; LHA : aire hypothalamique latérale ; PVT : noyau paraventriculaire thalamique ; SCN : noyau suprachiasmatique ; SPV : zone subparaventriculaire ; VLPO : aire préoptique ventrolatérale ; vTM : noyau tubéromammillaire ventral

(D'après Saper et al. 2005)

De plus, les VLPO sont connectées de manière réciproque avec les PVT qui sont eux-mêmes interconnectés avec les SCN. Il existe une inhibition réciproque entre PVT et VLPO qui sont respectivement impliqués dans l'éveil et le sommeil.

Au vu de ces quelques exemples, on peut supposer que l'équilibre entre veille et sommeil dépend de subtiles régulations impliquant tout un réseau de structures (qui ne sont pas toutes représentées sur la **Figure 9**). L'expression de la protéine FOS a été analysée dans ces

structures, pour voir si elle est contrôlée de manière circadienne et si des différences existent entre espèces nocturnes et diurnes, puisque leurs cycles veille-sommeil sont en opposition de phase.

Chez le Rat (*Novak et Nunez 1998*), un rythme d'expression de la protéine **FOS** est observé dans les cellules à galanine des **VLPO**, dont le **maximum a lieu pendant le jour**, lorsque l'animal dort, alors que ce **maximum** survient pendant sa **phase d'activité** dans des structures comme les **PVT**. Par contre, il n'existe pas de rythme dans les **vTM**. Chez le Rat du Nil (*Novak et al. 1999 ; 2000*), on trouve également un rythme d'expression de la protéine **FOS** dans les cellules à galanine des **VLPO**, dont le **niveau maximal** survient également lorsque **l'animal dort**, mais pendant la **nuît**. Dans les **PVT**, le **maximum** d'expression de **FOS** a lieu en **début de jour** lors de la première phase d'activité locomotrice. Dans les neurones histaminergiques des **vTM**, on trouve **deux pics**, l'un en **début de jour** et l'autre en **fin de jour**, quand survient la deuxième phase d'activité.

Ces résultats indiquent que les structures impliquées dans le sommeil sont actives en **anti-phase**, si l'on compare rongeurs nocturnes et diurnes. La majorité de ces structures est interconnectée avec les SCN. Cela permet à l'horloge circadienne principale, d'une part, de contrôler de manière circadienne ces structures et, d'autre part, d'être influencée par ces dernières, peut-être de la même manière, mais à des temps différents. **On peut alors supposer que ces informations d'éveil et de sommeil qui arrivent aux SCN en anti-phase entre espèces diurnes et nocturnes seront intégrées avec d'autres informations assurant ainsi le maintien de la diurnalité et de la nocturnalité.**

5. La température corporelle

La température corporelle est contrôlée de manière **homéostatique**, mais également de manière **circadienne**. Le rythme de température corporelle disparaît après lésion des SCN, ce qui met en évidence le contrôle circadien de cette sortie (*Eastman et al. 1984*). Cependant, cette lésion n'affecte pas la réponse thermorégulatrice (homéostatique) qui est régulée par les systèmes sympathiques et parasympathiques (*Wachulec et al. 1997*). Chez les animaux **nocturnes**, ce rythme présente des **valeurs maximales en milieu de nuit**, alors qu'elles surviennent en **milieu de jour** chez les animaux **diurnes** (*Eastman et al. 1984 ; Leproult et al. 2005 ; McElhinny et al. 1997 ; Piccione et al. 2005 ; Refinetti 1996*).

6. Les oscillations des gènes horloges hors des SCN

Les gènes horloges, en plus d'être exprimés dans les SCN, sont aussi présents dans **d'autres structures cérébrales**, ainsi que dans les **tissus périphériques**, comme le foie, les reins, les poumons et bien d'autres tissus. Ces oscillations périphériques sont synchronisées par les SCN par le biais de nombreux mécanismes. Il a été démontré, par exemple, qu'en obscurité constante, il existait dans le **foie de la Souris et du Hamster syrien**, un rythme d'expression de **l'ARNm de *Per1* et *Per2*** avec un **maximum** survenant en **début de nuit subjective**, c'est-à-dire dans un délai de 3 et 9 heures après le pic d'expression de ces gènes dans les SCN (*Tong et al. 2004 ; Zylka et al. 1998*). Des données montrent que chez le Rat du Nil, une espèce **diurne**, les **niveaux maximaux des ARNm de *Per1* et *Per2*** dans le foie surviennent en **début de jour**, soit approximativement 4 heures plus tôt que dans les SCN (*Lambert et Weaver 2006*). Il existe donc entre rongeurs diurnes et nocturnes, une inversion de la phase des oscillations circadiennes périphériques, du moins dans le foie.

Les oscillations des gènes horloges hors des SCN, ainsi qu'une grande partie des sorties rythmiques contrôlées par les SCN sont en opposition de phase entre espèces diurnes et nocturnes avec néanmoins quelques exceptions, comme le rythme de mélatonine. Cependant, ces sorties, dont certaines envoient des informations de rétrocontrôle aux SCN, sont vraisemblablement impliquées dans le maintien plutôt que dans l'établissement du caractère diurne ou nocturne.

V. Synchronisation des rythmes circadiens

1. Définition

Hormis le fait de générer des oscillations et de les distribuer au reste de l'organisme, une autre des propriétés fondamentales du système circadien est qu'il est capable d'être **synchronisé** (remis à l'heure) par de nombreux facteurs. Par la suite, nous focaliserons notre description sur la synchronisation journalière et n'aborderons pas la synchronisation saisonnière.

Le facteur synchroniseur le plus puissant est le **cycle lumière-obscurité** ou **facteur photique** qui impose une période de 24 h à l'horloge circadienne. Mais de nombreux autres synchroniseurs (dits **non-photiques**) sont capables d'influer sur les SCN et seront détaillés ultérieurement (voir V. 4.). Tous ces facteurs peuvent influencer la **période**, mais également la **phase** des rythmes circadiens. Afin de pouvoir agir sur l'horloge circadienne principale, ces

stimuli doivent pouvoir « communiquer » des informations à cette dernière. Toutes les voies d'entrée des SCN sont donc susceptibles de fournir des informations permettant la synchronisation.

2. Les voies d'entrée

Les projections neuronales se dirigeant vers l'horloge circadienne principale sont essentiellement situées dans la **partie ventrale des SCN** contenant les neurones à VIP. On dénombre **trois voies principales** d'entrée (**Figure 10**) ainsi que d'autres voies moins importantes.

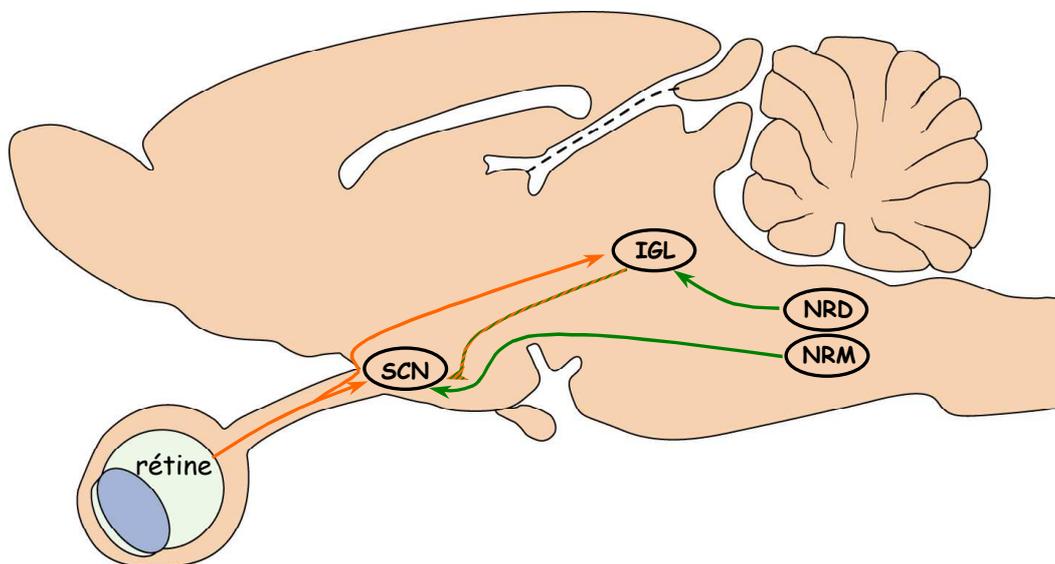


Figure 10 : Principales voies afférentes aux SCN

Les flèches orange représentent le transfert des informations photiques de manière directe (tractus rétino-hypothalamique) ou indirecte (voie rétino-géniculohypothalamique). Les flèches vertes représentent le transfert d'une partie des informations non-photiques via des projections sérotonergiques directes ou indirectes. IGL : feuillet inter-géniculé ; NRD : noyau du raphé dorsal ; NRM : noyau du raphé médian ; SCN : noyau suprachiasmatique.

a. La rétine, interface entre l'environnement et l'horloge

La rétine des Mammifères intervient de manière primordiale dans la détection et la transmission de l'intensité lumineuse vers le cerveau. Les **photons** sont perçus par des photopigments rétiniens situés dans les **bâtonnets** (rhodopsine) et les **cônes** (opsines). Les messages, générés par l'activation de ces photopigments, sont ensuite transmis aux cellules ganglionnaires de la rétine dont les axones forment le nerf optique. Ce dernier *via* une voie

polysynaptique, va innover le cortex occipital, où seront intégrées les informations permettant de générer des images. Il s'agit de la **réponse visuelle à la lumière**.

Il existe également des **réponses non-visuelles à la lumière**, notamment celle assurant la **synchronisation photique des SCN**. Ce type de réponse fait essentiellement intervenir la **mélanopsine**, un photopigment présent dans certaines **cellules ganglionnaires** de la rétine innervant les SCN (*Hattar et al. 2002*). Bien que la mélanopsine ait un rôle central dans ces réponses non-visuelles, les opsines et la rhodopsine paraissent également impliquées (*Barnard et al. 2004 ; Dkhissi-Benyahya et al. 2007 ; Güler et al. 2007*). Les cellules contenant de la mélanopsine représentent entre 1 et 2,5% du nombre total des cellules ganglionnaires chez les espèces nocturnes (*Hattar et al. 2002 ; Morin et al. 2003*). Chez le Rat, la mélanopsine présente des oscillations circadiennes de l'expression de son **ARNm** et de sa **protéine**, avec des **valeurs maximales** ayant lieu respectivement au **début de la nuit subjective** et à la **fin du jour subjectif** (*Hannibal et al. 2005*).

Chez les rongeurs diurnes il existe encore peu de travaux qui concernent la rétine et son implication dans la rythmicité circadienne. On peut citer que les **rythmes de phagocytose des bâtonnets et des cônes** de l'Arvicanthis soudanais présentent en LD un **maximum en début de jour** (*Bobu et al. 2006*). Ces données sont **similaires** à celles trouvées pour les bâtonnets chez animaux nocturnes mais pas pour les cônes (*LaVail 1976*). En effet, les espèces vivant la nuit n'en ont que très peu, contrairement au Rat du Nil et à l'Arvicanthis soudanais par exemple, chez lesquels les cônes représentent environ 35% de la composition des photorécepteurs (*Bobu et al. 2008 ; Gaillard et al. 2008*).

Deux voies, reliant la rétine aux SCN, ont été caractérisées chez les espèces nocturnes (*Miller et al. 1996 ; Morin et al. 1994*) et diurnes (*Goel et al. 1999, Smale et Boverhof 1999*). La première est directe et permet la synchronisation photique de l'horloge principale. Il s'agit du **tractus rétino-hypothalamique** (RHT) qui aboutit essentiellement dans la partie ventrolatérale des SCN et qui libère du **glutamate** et du **PACAP** (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide). Il existe pour ce tractus de petites différences inter-spécifiques indépendantes du caractère diurne ou nocturne. La seconde est une voie indirecte et sera évoquée ultérieurement (voir V. 2. b.).

Il est important de noter que des mutations dans la rétine sont capables de provoquer un changement de niche temporelle. Parmi elles, on peut citer les Souris doubles mutantes pour la mélanopsine et le RPE65 (retinal pigment epithelium enzyme 65) qui sont diurnes en comparaison avec les Souris sauvages qui sont nocturnes (*Doyle et al. 2008*). Le RPE65 joue un rôle clé dans les mécanismes qui permettent aux photorécepteurs de redevenir sensibles à

la lumière après une stimulation lumineuse. Apparemment, la perte de la mélanopsine et du RPE65 inverserait les mécanismes de détection de la lumière dans la rétine, par dégénérescence des cônes et de certaines cellules ganglionnaires. Cette inversion se répercuterait ensuite au niveau des SCN, inversant la phase des sorties de l'horloge et le rythme d'activité locomotrice. **Il apparaît donc que le fonctionnement de la rétine est important pour l'établissement de la diurnalité et de la nocturnalité, mais il n'est probablement pas le seul acteur déterminant le choix de la niche temporelle.**

b. Les feuillets intergénéculés thalamiques (IGL)

La deuxième voie d'entrée des informations photiques vers les SCN passe par une structure thalamique, les **IGL**. Cette structure reçoit des informations **photiques** en provenance de la rétine (*Morin et Allen 2006*), et **non-photiques** en provenance du noyau du raphé dorsal (NRD ; *Harrington 1997 ; Meyer-Bernstein et Morin 1996*). Ces informations vont être ensuite transmises dans la partie ventrolatérale des SCN *via* le **tractus géniculohypothalamique** (GHT) qui libère du **neuropeptide Y** (NPY) et du **GABA**. Cette structure, de par ses afférences et ses efférences, a un **rôle modulateur** dans les mécanismes de synchronisation photique et non-photique chez les animaux nocturnes et diurnes (*Goel et al. 2000 ; Morin 1999 ; Morin et Allen 2006*).

c. Les noyaux du raphé

Les projections sérotonergiques émanant du **noyau du raphé médian** (NRM) sont la troisième voie principale directe vers les SCN. Elles véhiculent essentiellement des informations **non-photiques** (*Meyer-Berstein et Morin 1996*). A ce jour aucune donnée anatomique n'a décrit cette voie chez un rongeur diurne. A partir du NRD, nous avons déjà indiqué qu'il existe également une voie indirecte reliant les SCN *via* les IGL. De plus, chez certaines espèces (Rat et Chat), des fibres rétiniennes innervent les noyaux du raphé (*Foote et al. 1978 ; Shen et Semba 1994*). Cette observation indique que les informations photiques pourraient aussi atteindre les SCN indirectement *via* le raphé, du moins chez certaines espèces. Les noyaux du raphé seront détaillés ultérieurement (voir VI. 1. a.).

d. Les autres entrées

D'autres types de fibres afférentes aux SCN ont été décrites. Des **fibres cholinergiques** émanant du télencéphale basal (noyau de la bandelette diagonale de Broca et noyau basal de Meinert) innervent les SCN (*Bina et al. 1993*). Leur activation module positivement les effets

de la lumière sur les SCN (*Erhardt et al. 2004 ; Zatz et Herkenham 1981*). Il existe également des **fibres histaminergiques** reliant les noyaux tubéro-mammillaires aux SCN, qui auraient également un rôle dans la synchronisation photique (*Eaton et al. 1996 ; Itowi et al. 1991*). Enfin des **fibres catécholaminergiques** (libérant en partie de la dopamine) innervent modestement les SCN (*Jacomy et Bosler 1995*).

3. La synchronisation photique

a. Niveau physiologique

À partir de la rétine, les informations photiques vont permettre une **remise à l'heure** quotidienne de l'horloge suprachiasmatique. La phase de cette horloge peut être avancée ou retardée jusqu'à 2 h par jour chez la plupart des espèces, en fonction du moment pendant lequel la rétine perçoit la lumière (*Daan et Pittendrigh 1976 ; Takahashi et al. 1984*). La lumière exerce son pouvoir synchroniseur essentiellement pendant la **période nocturne**, c'est-à-dire pendant la période d'activité des animaux nocturnes et de sommeil des animaux diurnes (dans les deux cas, il s'agit de la nuit subjective en DD). Les différentes réponses circadiennes, répercutées sur l'activité locomotrice en fonction de l'heure d'exposition à des stimulations lumineuses en DD, permettent de définir une « **courbe de réponse de phase à la lumière** » (**Figure 11**).

Cette courbe a un profil **très similaire**, que l'on considère les espèces **nocturnes** (*Daan et Pittendrigh 1976 ; Takahashi et al. 1984*) ou **diurnes** telles que le Tamia asiatique (*Honma et Honma 1999*), le Degu du Chili (*Kas et Edgar 2000*) le Rat du Nil (*Mahoney et al. 2001*) et l'Arvicanthis soudanais (*Caldelas et al. 2003 ; Slotten et al. 2005*). Elle présente des **retards de phase** de l'activité locomotrice qui s'étendent de la **fin du jour subjectif jusqu'au milieu de la nuit subjective** et des **avances de phase** qui s'étendent du **milieu de la nuit subjective jusqu'au début du jour subjectif**. Cependant, on peut noter une différence intéressante entre espèces nocturnes et diurnes, puisqu'il existe une zone temporelle, beaucoup plus étendue chez les rongeurs nocturnes que chez les rongeurs diurnes, pendant laquelle la lumière n'a pas d'effet de déphasage de l'horloge circadienne principale (**zone morte** pendant le jour subjectif). Cette zone est même absente chez l'Homme (*Jewett et al. 1997*). Le fondement de cette différence est inconnu à l'heure actuelle.

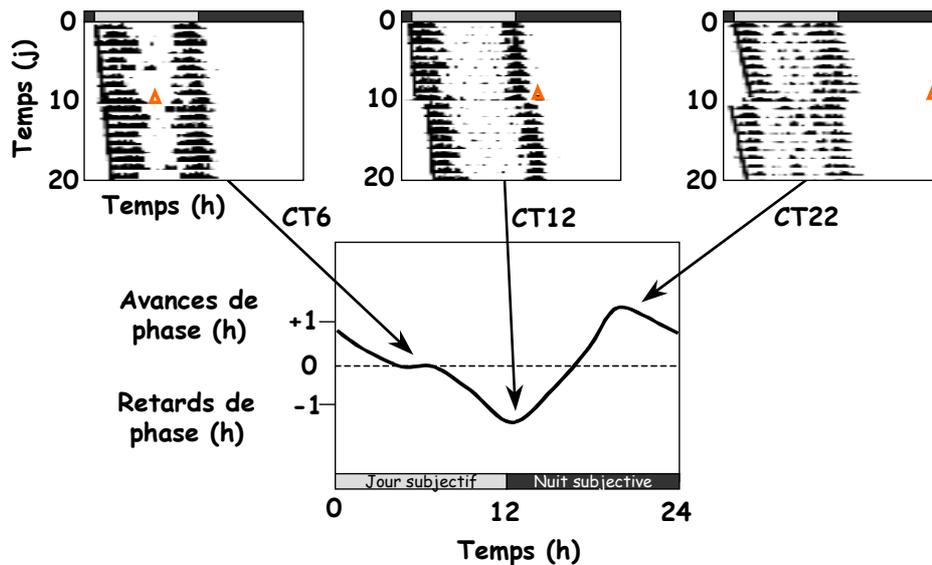


Figure 11 : Courbe de réponse de phase à la lumière chez l'*Arvicanthis sudanais*.

Le créneau lumineux (1 h, 100 lux) est indiqué par un triangle orange sur les différents actogrammes. En milieu de jour subjectif (CT6) il est sans effet, alors qu'en début (CT12) ou en fin (CT22) de nuit subjective, il provoque respectivement des retards et des avances de phase de l'activité locomotrice.

(D'après Caldelas et al. 2003)

Le même type de courbe de réponse de phase a été obtenu en réalisant des injections de NMDA (N-méthyl D-aspartate) *in vivo*, un agoniste glutamatergique, qui mime donc les effets de la lumière chez les animaux nocturnes (Mintz et al. 1999) et diurnes (Novak et Albers 2002). Ceci suggère que les **récepteurs au NMDA** sont impliqués dans les mécanismes de la synchronisation photique.

Les déphasages provoqués par la lumière vont permettre à l'organisme de s'adapter au **décalage horaire** par exemple. Quand les animaux sont soumis à un nouveau cycle LD avancé ou retardé de quelques heures, les SCN intègrent rapidement ce nouveau cycle. Les fonctions contrôlées par l'horloge ne mettent pas toutes le même temps pour se synchroniser à ces nouvelles conditions (Yamazaki et al. 2000). Quand on observe l'activité locomotrice, elle dérive (se resynchronise) pendant plusieurs jours afin de s'ajuster au nouveau cycle LD (Daan et Aschoff 2001).

b. Niveau cellulaire

Les cascades intracellulaires induites par une stimulation lumineuse dans les SCN ont été bien étudiées. Trois voies ont été en partie caractérisées, l'une est effective toute la nuit, les deux autres le sont respectivement en début et en fin de nuit (**Figure 12**).

D'une manière générale, après un créneau de lumière, du **glutamate** est libéré par les terminaisons du RHT dans les SCN. Ce neurotransmetteur va activer des **récepteurs NMDA** permettant un **influx de Ca²⁺**. Le blocage de ces récepteurs va nettement diminuer les effets de la lumière sur l'horloge (Vuillez *et al.* 1998) mettant en évidence leur rôle prépondérant, bien que les SCN possèdent également des récepteurs de type non-NMDA (Ebling 1996 ; Gannon *et Rea* 1994).

Cet influx de Ca²⁺ va provoquer l'activation de la **NO synthase** (NOS) qui va permettre la production de **monoxyde d'azote** (NO), dernière étape commune induite par des créneaux de lumière appliqués en début ou en fin de nuit (Ding *et al.* 1994). En début de nuit, cette synthèse aboutirait à l'activation des **récepteurs à ryanodine** et à la mobilisation des stocks de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (Ding *et al.* 1998). En fin de nuit, le NO active la **guanylate cyclase** (GC) qui va conduire à la synthèse de **GMPc** (Ding *et al.* 1998). En plus de ces deux voies, la voie de **l'AMPc** est activée par un créneau de lumière à n'importe quel moment de la nuit (Takahashi *et al.* 2003).

Ces trois voies aboutissent *via* l'activation de différentes kinases dont la **protéine kinase A** (PKA) et **ERK** (extracellular signals regulated kinase), à la phosphorylation de la protéine **CREB** (Ginty *et al.* 1993 ; Obrietan *et al.* 1999 ; Von Gall *et al.* 1998). Une fois phosphorylée, **P-CREB** migre dans le noyau où il se fixe sur des **motifs CRE** (Ca²⁺/cAMP-responsive element) pour activer la **transcription des gènes** impliqués dans la synchronisation photique, tel que *Per1* (Ding *et al.* 1997 ; Obrietan *et al.* 1999 ; Von Gall *et al.* 1998).

Le **PACAP** et la **substance P** qui sont libérés avec le glutamate à partir des terminaisons du RHT joueraient également un rôle dans la synchronisation photique (Hannibal *et al.* 1997 ; Kim *et al.* 2001). En effet, la courbe de réponse de phase obtenue après injection de l'un de ces neuropeptides est similaire à celle induite par la lumière (Piggins *et al.* 2001a ; Piggins *et Rusak* 1997). Concernant le PACAP, il activerait le récepteur **PAC₁**, ce qui induirait une **augmentation de Ca²⁺ intracellulaire** *via* l'activation de la **phospholipase C** (PLC) et la voie de **l'AMPc** (Kopp *et al.* 1999).

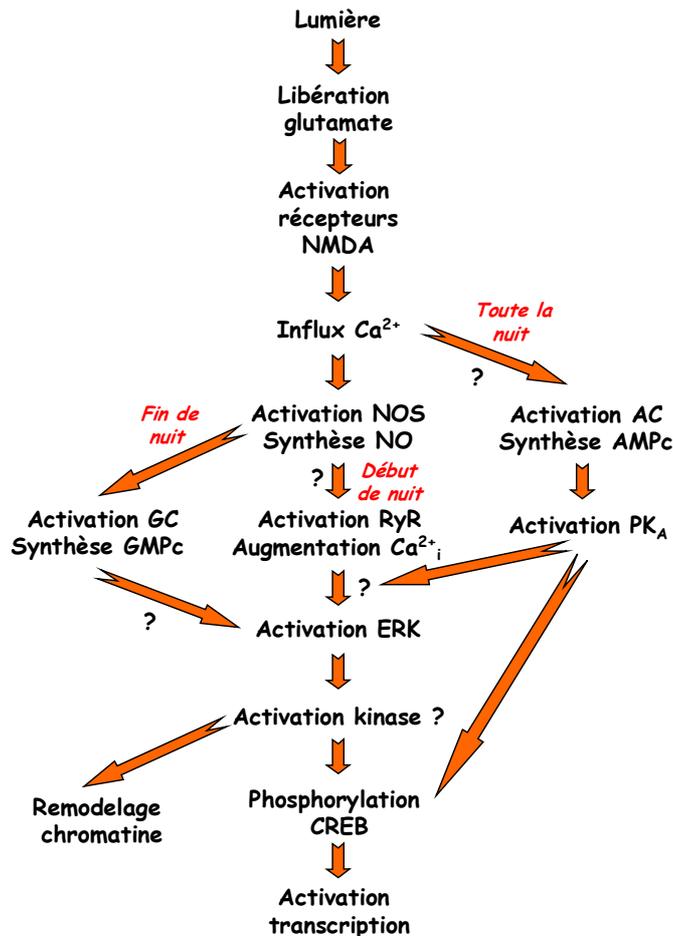


Figure 12 : Voies de transduction intracellulaire susceptibles d'être impliquées dans la synchronisation photique.

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; CREB : Ca²⁺/cAMP-responsive element binding protein ; ERK : extracellular signals regulated kinase ; GC : guanylate cyclase ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; NOS : NO synthase ; NO : monoxyde d'azote ; PK_A : protéine kinase A ; RyR : récepteurs à la ryanodine.

(D'après Cermakian et Sassone-Corsi 2002)

c. Niveau moléculaire

La transcription d'un certain nombre de gènes est activée en réponse à un créneau de lumière. Les gènes de réponse précoce, comme *c-fos* et *Jun B* sont très rapidement transcrits en réponse à une stimulation lumineuse perçue pendant la nuit, **aussi bien chez les espèces diurnes que nocturnes** (Guido et al. 1999a ; 1999b ; Mahoney et al. 2001). Une fois traduits, ces éléments forment des hétérodimères qui vont ensuite activer la transcription des gènes tardifs aboutissant à des déphasages de l'activité locomotrice (Rusak et al. 1990 ; Kornhauser et al. 1990 ; 1992 ; Miller et al. 1996). FOS jouerait un rôle important dans ces mécanismes

de synchronisation photique, car des sondes oligo-désoxynucléotidiques anti-*c-fos* et anti-*c-Jun* réduisent les déphasages induits par un créneau lumineux (Wollnik et al. 1995). Cependant, les Souris mutantes pour *c-fos* présentent des réponses comportementales à la lumière quasiment normales (Honrado et al. 1996). **FOS n'a donc qu'un rôle secondaire** dans les mécanismes de synchronisation photique, et d'autres gènes sont certainement impliqués de manière plus importante.

L'expression des gènes *Per1* et *Per2* a été la plus étudiée en réponse à des stimulations lumineuses, car elle est **fortement induite** dans l'heure suivant la stimulation chez les espèces diurnes et nocturnes (Albrecht et al. 1997 ; Caldelas et al. 2003 ; Shearman et al. 1997 ; Shigeyoshi et al. 1997). Pour *Per1*, l'activation de cette transcription passerait par **CREB**, qui une fois phosphorylée en réponse à la lumière se fixerait sur le site CRE. Le promoteur de *Per1* possède ce site et sa transcription peut donc être activée par P-CREB (Gau et al. 2002 ; Tischkau et al. 2003 ; Travnickova-Bendova et al. 2002).

Des différences temporelles ont été trouvées en ce qui concerne l'induction de la transcription de *Per1* et *Per2* pendant la nuit subjective. Alors que ***Per1* est rapidement induit** et cela pendant **toute la nuit**, l'expression de ***Per2* est induite rapidement en début de nuit et plus lentement voire même pas du tout en fin de nuit** (Albrecht et al. 1997 ; Caldelas et al. 2003 ; Miyake et al. 2000 ; Shearman et al. 1997 ; Shigeyoshi et al. 1997 ; Yan et al. 1999 ; Yan et Silver 2002 ; Zylka et al. 1998).

Des différences spatiales ont également été rapportées. Chez les espèces nocturnes, en début de nuit, un créneau de lumière induit une augmentation de ***Per1*** dans la région **ventrolatérale** des SCN alors que ***Per2*** est induit dans les régions **ventrolatérale et dorsolatérale** (Dardente et al. 2002 ; Moriya et al. 2000 ; Yan et Silver 2002). En fin de nuit, l'ARNm de ***Per1*** en réponse à la lumière est exprimé **partout** dans les SCN (Yan et Silver 2002).

Des preuves mettent en évidence le rôle fondamental de *Per1* et *Per2* dans les mécanismes de synchronisation photique. D'une part, des injections intra-cérébroventriculaires de sondes oligo-désoxynucléotidiques anti-*Per1* ou anti-*Per2* inhibent les retards de phase produits par la lumière en début de nuit (Akiyama et al. 1999 ; Wakamatsu et al. 2001). D'autre part, les Souris mutantes pour *Per1* et *Per2* présentent respectivement des avances et des retards de phase réduits, voire absents, en comparaison à ceux observés chez les Souris sauvages (Albrecht et al. 2001).

D'autres gènes sont également modulés en réponse à des créneaux de lumière :

- L'expression de **Bmal1** est augmentée en tout début de jour chez les rongeurs nocturnes (Abe et al. 1998), mais pas chez l'Arvicanthis soudanais, une espèce diurne (Caldelas et al. 2003).
- L'expression de **Cry2** semble être diminuée en fin de nuit chez la Souris (Okamura et al. 1999) alors que ce phénomène a lieu toute la nuit chez l'Arvicanthis soudanais (Caldelas et al. 2003).
- L'expression de **Dec1** est induite toute la nuit chez les rongeurs nocturnes (Honma et al. 2002), alors que l'expression des caséine kinases semble être induite par la lumière, mais avec un délai (Ishida et al. 2001).
- **Rev-erba** et **Rorb** seraient également influencés par une stimulation lumineuse. En effet les avances de phase comportementales induites en fin de nuit sont plus grandes chez les Souris mutantes pour ces gènes en comparaison à celles obtenues chez les Souris sauvages (Masana et al. 2007 ; Preitner et al. 2002). Par contre les Souris mutantes pour **Rorb** présentent le même type de réponse que celles des Souris sauvages en réponse à des créneaux de lumière appliqués en début de nuit (Masana et al. 2007).

4. La synchronisation non-photique

a. Définition

La lumière est considérée comme le facteur le plus puissant pour synchroniser l'horloge circadienne principale. Cependant, cette dernière est susceptible d'être influencée par une multitude d'autres facteurs dits **non-photiques** (par opposition au facteur photique). Chez les **animaux nocturnes**, la majorité de ces facteurs, appliqués durant le **jour subjectif**, induisent des **avances de phase** de l'activité locomotrice et ont une **action inhibitrice** sur la transcription de certains **gènes horloges**. Quelques études rapportent également de petits retards de phases comportementaux durant la nuit subjective, mais ceux-ci ne sont pas systématiquement présents et apparaissent donc négligeables (**Figure 13**).

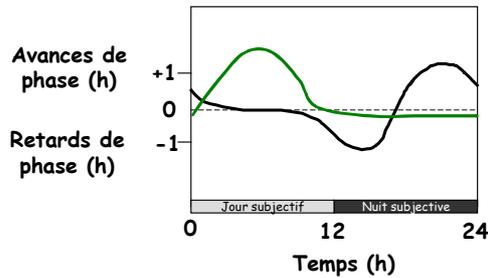


Figure 13 : Courbe de réponse de phase aux stimuli photiques (courbe noire) et non-photiques (courbe verte) chez le Hamster syrien.

(D'après Challet et Pévet, 2003)

Néanmoins, il semble que les SCN des **animaux diurnes** réagissent **différemment** en fonction du facteur non-photique étudié, comme nous le verrons par la suite. Il est important de rappeler qu'afin d'observer les effets des facteurs non-photiques, **les animaux sont placés en DD** (en Light-Light ou LL pour les créneaux d'obscurités). Ces conditions permettent de s'affranchir des effets directs de la lumière, phénomène que l'on nomme « **masquage** », ainsi que des effets synchroniseurs de la lumière. Un **masquage négatif** correspond à un processus empêchant la composante circadienne de s'exprimer pleinement (Aschoff et al. 1982). Par exemple, chez les animaux nocturnes, une exposition à la lumière pendant la nuit a un effet inhibiteur sur l'activité locomotrice (Redlin 2001). Le **masquage positif** permet à une variable de s'exprimer en plus de sa composante circadienne. Ainsi, un créneau de lumière appliqué pendant la nuit va induire une activité locomotrice chez des rongeurs diurnes censés être inactifs (Redlin et Mrosovsky 2004). Les composantes circadiennes ne se caractérisent donc dans leur totalité qu'en conditions environnementales constantes (DD), ce qui permet un « **démasquage** » des variables considérées.

b. Activité, sommeil et sérotonine

L'hyperactivité transitoire induite pendant la phase de sommeil des animaux nocturnes, comme le Hamster syrien (correspondant au jour subjectif), est l'un des facteurs non-photiques le mieux étudié. Afin d'induire cette hyperactivité, l'animal doit avoir **accès à une nouvelle roue pendant le jour subjectif**, ce qui provoque chez lui une forte activité, se traduisant ultérieurement par une **avance de phase** de l'activité locomotrice (Reebs et Mrosovsky 1989). Cette hyperactivité est considérée comme cruciale pour l'induction de l'avance de phase, car si l'animal court peu ou est immobilisé, ces avances de phases sont alors très faibles, voire indétectables. Une étude plus récente (Antle et Mistlberger 2000),

menée chez le Hamster syrien, montre que le facteur causant ces avances de phase ne serait pas le degré d'activité physique en soi, mais plutôt **la privation de sommeil**. Ce facteur est efficace uniquement pendant le jour subjectif chez les animaux nocturnes, car c'est à ce moment qu'ils dorment. Néanmoins, la Souris ne présente pas de déphasage en réponse à une privation de sommeil (*Challet et al. 2001*) et chez le Rat, les déphasages produits par une hyperactivité sont faibles (*Mistlberger 1991*). Il semblerait donc qu'il existe dans ce cas une sensibilité différentielle de l'horloge circadienne principale en fonction de l'espèce étudiée. Chez les rongeurs diurnes, les études sur la privation de sommeil sont quasi-inexistantes. Chez le Spermophile d'Europe, le confinement dans une roue, réalisé chaque jour à la fin de la période d'activité est capable de synchroniser l'activité locomotrice (*Hut et al. 1999*). Selon les auteurs, ce confinement, pratiqué en toute fin de jour subjectif, induit des avances de phase de l'activité locomotrice, ce qui permet la synchronisation. Ces résultats seraient donc similaires à ceux obtenus chez les espèces nocturnes. Cependant, il est possible que ce soit en tout début de nuit subjective qu'agisse ce facteur (car le confinement dure 3 h), ce qui correspondrait plus aux effets non-photiques de la privation de sommeil (puisque cette espèce est diurne et entre donc en période de sommeil en début de nuit) et marquerait donc une différence entre espèces nocturnes et diurnes. Chez l'Homme par contre, il a été montré qu'un exercice physique conduit à des retards de phase lorsqu'il est pratiqué de manière soutenue en début de nuit (*Buxton et al. 1997 ; 2003 ; Van Reeth et al. 1994*).

Chez le Hamster syrien, **l'activité induite** par une nouvelle roue provoque une **diminution transitoire** des niveaux d'ARNm de *Per1* et *Per2* dans les SCN (*Maywood et al. 1999 ; Maywood et Mrosovsky 2001*).

Au niveau cérébral, plusieurs arguments peuvent être avancés pour expliquer de quelle manière sont générées ces avances de phase. Nous avons évoqué précédemment qu'il existait des projections sérotonergiques émanant des noyaux du raphé (NRM et NRD) qui aboutissent aux SCN, de manière directe et indirecte (*Meyer-Berstein et Morin 1996*). Par ailleurs, si l'on induit une hyperactivité chez le Hamster syrien, la libération endogène de 5-HT provenant des fibres du NRM augmente dans les SCN (*Dudley et al. 1998*). De plus, le système sérotonergique joue un rôle dans la régulation de la veille et du sommeil, puisque certains neurones du raphé sont actifs spécifiquement pendant la veille (*Jacobs et Fornal 1999*). Enfin, chez les espèces nocturnes, des injections d'agonistes sérotonergiques, réalisées en milieu de jour subjectif, induisent des avances de phase de l'activité locomotrice, couplées à une diminution de la transcription de *Per1* et *Per2* (*Cutrera et al. 1994 ; 1996 ; Horikawa et al. 2001 ; Horikawa et Shibata 2004 ; Mendoza et al. 2008*). Ces résultats sont similaires à ceux

obtenus avec la privation de sommeil. Tous ces arguments impliquent donc fortement le système 5-HT dans la modulation non-photique de l'horloge circadienne principale. Cependant nous détaillerons ultérieurement le rôle modulateur de ce système au niveau des SCN (voir VI. 5.).

c. Neuropeptide Y

Le **NPY** est libéré par les terminaisons du GHT dans les SCN. De nombreuses études, réalisées uniquement chez des espèces nocturnes, ont montré qu'il agissait comme un facteur non-photique. *In vivo*, des micro-injections de **NPY** dans les SCN (Huhman et Albers 1994), ainsi que des stimulations électriques des projections géniculo-hypothalamiques (Harrington 1997), induisent des **déphasages de type non-photique**. *In vitro*, sur des tranches suprachiasmatiques, l'application de NPY pendant le jour subjectif induit des avances de phase de l'activité électrique multi-unitaire (Biello et al. 1997a).

L'injection intra-cérébroventriculaire d'un anticorps anti-NPY, ainsi que des lésions des IGL réduisent ou inhibent les avances de phases induites par l'accès à une nouvelle roue (Biello et al. 1994 ; Schuhler et al. 1998).

Pour agir, le NPY se fixerait sur les **récepteurs Y2** (Golombek et al. 1996; Huhman et al. 1996) ayant pour effet d'activer la **protéine kinase C** (Biello et al. 1997b). Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, le **NPY** induit une **diminution transitoire** du niveau des ARNm de *Per1* et *Per2* dans les SCN (Fukuhara et al. 2001 ; Maywood et al. 2002). Tous ces résultats indiquent que les IGL et donc le NPY participent à la synchronisation non-photique, comme les noyaux du raphé et la 5-HT.

d. GABA

Le **GABA** est présent non seulement dans les cellules des SCN, mais aussi dans les cellules des IGL (Moore et Speh 1993). Chez le Hamster syrien, des études ont montré que le **muscimol** (un agoniste des récepteurs GABA_A) mime les **effets non-photiques**. Lorsqu'il est injecté dans les SCN pendant le **jour subjectif**, il provoque des **avances de phase** de l'activité locomotrice (Mintz et al. 2002 ; Smith et al. 1989). Chez le Rat du Nil, un rongeur **diurne**, le **muscimol** agit également pendant le **jour subjectif**, mais il induit des **retards de phase** (Novak et Albers 2004a). Malgré cette différence dans les effets comportementaux, le muscimol induit globalement le même type de réponse moléculaire chez ces deux espèces. On observe une inhibition de l'expression de *Per1* et *Per2* dans les SCN du Hamster syrien

(Ehlen et al. 2006) et une inhibition de celle de *Per2* dans les SCN du Rat du Nil (Novak et al. 2006).

Cette différence met en avant le fait que les informations non-photiques pourraient avoir une influence sur l'établissement et/ou le maintien de la diurnalité et de la nocturnalité et incite à multiplier les études sur les facteurs non-photiques chez les espèces diurnes.

e. Créneaux d'obscurité

Le **créneau d'obscurité** ou « *dark pulse* » est un facteur non-photique un peu particulier, parfois appelé facteur anti-photique. En effet pour étudier ses effets, les animaux doivent être soumis à des conditions de **lumière constante** tout au long des 24 h (LL). La plupart des animaux sont alors en libre-cours mais ils expriment une période différente de celle observée en DD. Dès lors, un **créneau d'obscurité** de quelques heures appliqué pendant le **jour subjectif** va induire des **avances de phase** de l'activité locomotrice chez les espèces **nocturnes** (Boulos et Rusak 1982 ; Canal et Piggins 2006 ; Ellis et al. 1982 ; Rosenwasser et Dwyer 2001). De plus, chez le Hamster syrien, ces **créneaux d'obscurité** induisent une **diminution transitoire** de l'expression de *Per1* et *Per2* dans les SCN, comme pour les autres facteurs non-photiques (Coogan et Piggins 2005 ; Mendoza et al. 2004). Les effets de ces créneaux d'obscurité ont également été observés chez un rongeur **diurne**, l'Arvicanthis soudanais (Mendoza et al. 2007). La sensibilité temporelle de l'horloge pour ce facteur non-photique diffère de celle des rongeurs nocturnes, puisque les effets de **déphasage** ont lieu principalement pendant la **nuît subjective** (et en fin de jour subjectif). Cependant, que ce soit pour les rongeurs nocturnes ou diurnes, ce facteur agit essentiellement pendant la période de repos des animaux. Toutefois, les créneaux d'obscurité provoquent une **diminution** de l'expression de *Per1* et de *Per2* dans les SCN de l'Arvicanthis soudanais et du Hamster syrien (Mendoza et al. 2007).

f. Mélatonine

Comme nous l'avons déjà évoqué, la **mélatonine** est une hormone synthétisée par la glande pinéale et libérée dans la circulation générale pendant la nuit. Sa synthèse est régulée de manière circadienne. De plus, elle peut rétroagir sur l'horloge circadienne principale puisque des récepteurs à la mélatonine sont présents dans les neurones des SCN. Néanmoins, les injections de mélatonine ayant un effet sur l'horloge sont réalisées à doses beaucoup plus

élevées que les concentrations physiologiques. Le rôle que peuvent avoir ces récepteurs d'un point de vue physiologique n'est donc pas encore clairement identifié. **La mélatonine** figure parmi les facteurs non-photiques, car elle engendre des **avances de phases** lorsqu'elle est appliquée en **fin de jour subjectif** chez les animaux **nocturnes** (*Armstrong et al. 1986*). Ces effets seraient dépendants de l'activation des **récepteurs MT2** à la mélatonine et de la **protéine kinase C** (*Hunt et al. 2001 ; McArthur et al. 1997*). En effet, une inhibition de ces récepteurs bloque les avances de phases comportementales. Par contre, l'expression des gènes **Per n'est pas modifiée** en réponse à des injections de mélatonine (*Poirel et al. 2003*).

Lorsque l'on réalise des infusions de mélatonine (1 h), répétées chaque jour à la même heure, on constate que ces injections chroniques ne sont capables de **synchroniser** l'activité locomotrice sur 24 heures que lorsqu'elles coïncident avec la **fin du jour** chez les animaux **nocturnes** (*Pitrosky et al. 1999*) ou **diurnes** (*Slotten et al. 2002*). En d'autres termes, les infusions de mélatonine provoquent chaque jour une avance de phase de l'activité locomotrice, ce qui permet la synchronisation. **Les espèces nocturnes et diurnes semblent donc être sensibles à cette hormone au même moment du cycle LD (crépuscule), c'est-à-dire en opposition de phase si l'on considère leur cycle veille-sommeil.**

g. Facteurs alimentaires

La **restriction alimentaire** agit de manière très différente comparée aux autres facteurs non-photiques. En effet chez des Rats maintenus en DD, des **créneaux d'accès limité à la nourriture** (ou restriction alimentaire temporelle) induisent une **activité locomotrice anticipant l'accès à la nourriture**, phénomène qui **n'est pas directement contrôlé par les SCN** (*Boulos et al. 1980 ; Gibbs 1979 ; Honma et al. 1983 ; Mistlberger 1994*). Dans ce protocole, malgré un temps limité d'accès à la nourriture, les animaux arrivent à manger une ration complète. Un autre protocole consiste à limiter la quantité de nourriture donnée à l'animal, on parlera alors de **rations hypocaloriques** (*Challet et al. 1996 ; 1997*). Lors d'une restriction alimentaire calorique, la ration hypocalorique va être capable de synchroniser les rythmes circadiens contrôlés par les SCN et d'agir sur l'horloge circadienne principale elle-même. La restriction alimentaire est donc capable de « switcher » en partie l'activité locomotrice des animaux nocturnes qui présente alors une composante partiellement diurne.

L'étude des facteurs photique et non-photiques a permis de dégager quelques différences entre animaux diurnes et nocturnes (Tableau 1). Cependant, le manque de résultats chez les espèces diurnes limite la compréhension des mécanismes impliqués

dans ces différences. Il est pour l'heure impossible d'estimer si les facteurs non-photiques permettent uniquement le maintien ou participent également à l'établissement du caractère diurne ou nocturne.

Type de facteur	Rongeurs nocturnes		Rongeurs diurnes	
	Activité locomotrice	Expression <i>Per1</i> et <i>Per2</i>	Activité locomotrice	Expression <i>Per1</i> et <i>Per2</i>
Lumière	1. Retards de phase : début de nuit (veille) 2. Avances de phase : fin de nuit (veille)	Augmentation en début et fin de nuit	1. Retards de phase : début de nuit (sommeil) 2. Avances de phase : fin de nuit (sommeil)	Augmentation en début et fin de nuit
Hyperactivité	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	Avance de phase : fin de jour ou début de nuit (veille ou sommeil ?)	?
5-HT	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	?	?
NPY	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	?	?
GABA	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	Retards de phase : milieu de jour (veille)	Diminution <i>Per2</i>
Créneau d'obscurité	Avances de phase : jour (sommeil)	Diminution	Avances de phase : nuit (sommeil)	Diminution
Mélatonine	Avances de phase : fin de jour (sommeil)	Pas d'effet	Avances de phase : fin de jour (veille)	?

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des effets des différents facteurs synchroniseurs de l'horloge chez les espèces nocturnes et diurnes.

5. Quand le photique rencontre le non-photique

Dans les conditions normales, l'horloge circadienne principale intègre de nombreuses informations en même temps. Expérimentalement, de nombreux **facteurs non-photiques** sont justement capables de **moduler la synchronisation photique** qui a lieu essentiellement pendant la **nuit**. D'un autre côté, **la lumière** a elle aussi un **rôle modulateur** sur la **synchronisation non-photique** pendant le **jour**.

Cependant, l'intégration concomitante des informations photique et non-photiques est complexe. Elle ne résulte pas de simples phénomènes additifs, dont les effets pourraient être prédits à partir de l'étude de chaque stimulus appliqué séparément (*Sinclair et Mistlberger 1997*). Nous n'effectuerons pas ici une étude exhaustive de toutes les modulations possibles, mais nous nous attacherons à citer quelques exemples résumant la complexité de ces phénomènes.

a. Pendant la nuit

Une grande partie des facteurs non-photiques que nous avons énoncés précédemment ont un pouvoir modulateur sur la synchronisation photique. Cette modulation peut altérer (réduire ou potentialiser) les déphasages induits par la lumière, et donc agir sur la vitesse de resynchronisation (ralentir ou accélérer). Encore une fois, **les résultats obtenus concernent quasi-exclusivement les animaux nocturnes.**

L'accès à une roue pendant la nuit subjective réduit l'amplitude des avances de phase induites par la lumière, mais il est sans effet sur les retards de phase (*Ralph et Mrosovsky 1992*). De plus, une **privation de sommeil pendant le jour subjectif diminue les retards de phase** produits par un créneau lumineux nocturne chez le Hamster syrien et la Souris (*Challet et al. 2001 ; Mistlberger et al. 1997*).

Les **agonistes 5-HT** (que nous détaillerons dans la partie VI. 5) et le **NPY** ont également une influence sur la synchronisation photique. *In vivo*, le **NPY** est capable **d'inhiber les avances de phases** induites par la lumière, mais il est sans effet sur les retards (*Weber et Rea 1997*). Néanmoins, des études plus récentes démontrent que le **NPY** peut agir **négativement**, à la fois sur **les avances et les retards de phase** (*Lall et Biello 2003a ; 2003b*). *In vitro*, le NPY peut inhiber les avances et les retards de phase produits par le glutamate (*Biello et al. 1997b*) et le NMDA (*Yannielli et Harrington 2001a ; 2001b*). Cette inhibition serait due à l'activation des **récepteurs Y5**, puisque l'injection d'antagonistes de ce récepteur bloque la modulation négative de la synchronisation lumineuse (*Lall et Biello 2003b*).

L'influence **GABAergique** de la synchronisation photique a également été étudiée et des données sont disponibles à la fois chez des rongeurs nocturnes et diurnes. Chez le Hamster syrien, l'activation des récepteurs GABA_A par le **muscimol bloque les déphasages** (avances et retards) induits par la lumière (*Gillespie et al. 1996 ; 1997*). Les effets du muscimol sur la synchronisation photique chez le Rat du Nil (*Novak et Albers 2004b*) sont les **mêmes** que chez le Hamster syrien. Des données similaires entre espèces nocturnes et diurnes ont également été observées pour la modulation des effets de la lumière *via* l'activation des récepteurs GABA_B (*Novak et al. 2004*). De manière surprenante, il n'y a donc **pas de différences** entre espèces **nocturnes** et **diurnes** pour la modulation GABAergique des déphasages induits par la lumière, alors qu'il en existe pour les effets non-photiques du GABA sur les SCN.

Concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la synchronisation photique, une théorie unificatrice a été proposée (*Maywood et Mrosovsky 2001*). **L'induction**

de la transcription des gènes *Per1* et *Per2* par la lumière pendant la nuit serait inhibée par les facteurs non-photiques. En effet, puisque ces derniers ont une action négative sur la transcription de ces gènes pendant le jour, ils pourraient avoir le même effet pendant la nuit, ce qui bloquerait l'effet photique à l'échelle moléculaire. Cette hypothèse a déjà été étayée par des injections de brotizolam, une benzodiazépine (Yokota et al. 2000), de NPY (Brewer et al. 2002) et partiellement pour celles d'agonistes GABA_A (Ehlen et al. 2008 ; Novak et al. 2006). Cependant, **la situation est certainement plus complexe.** En effet, chez le Hamster syrien par exemple, un accès à une nouvelle roue altère les déphasages induits par la lumière sans affecter l'expression de *Per1* dans les SCN (Christian et Harrington 2002; Edelstein et al. 2003). Il apparaît que de nombreux autres mécanismes doivent probablement entrer en jeu à d'autres niveaux de l'horloge (mécanismes post-traductionnels, stabilité des ARNm...).

b. Pendant le jour

Alors que la lumière n'a pas ou peu d'effet durant le jour, elle est capable de moduler la synchronisation non-photique. Les **déphasages** induits par le confinement dans une **nouvelle roue en milieu de jour sont réduits** si ce confinement est suivi par un créneau de lumière (Mrosovsky 1991). Il en est de même pour les effets de déphasages produits par le **NPY** ou par des **agonistes sérotonergiques ou GABAergiques** injectés de manière systémique ou localement. **Ces déphasages sont modulés négativement par la lumière** (Biello et Mrosovsky 1995 ; Caldelas et al. 2005 ; Challet et al. 1998 ; Maywood et al. 2002 ; Mintz et al. 2002 ; Penev et al. 1997). L'ordre dans lequel la stimulation lumineuse et le stimulus non-photique sont présentés (lumière avant, pendant ou après) ne semble pas déterminant dans l'effet inhibiteur de la lumière, du moins pour certains facteurs non-photiques.

Il semble que la réduction de l'expression des gènes *Per* induite par l'accès à une **nouvelle roue** ou une injection de **NPY** est **bloquée** lorsque le confinement ou l'injection est suivi d'un **créneau de lumière** (Maywood et al. 2002 ; Maywood et Mrosovsky 2001). Par contre la **lumière est sans effet** sur l'inhibition de *Per1* induite par des injections d'**agonistes GABA_A** (Ehlen et al. 2008).

Enfin, il est également intéressant de noter que pendant le jour, **les facteurs non-photiques peuvent interagir entre eux.** Par exemple, le NPY bloque les déphasages provoqués par l'administration de 5-HT en milieu de jour subjectif (Prosser 1998). Par contre, en fin de jour subjectif, la 5-HT ou des agonistes 5-HT ne modifient pas les avances de phases provoquées par l'application de NPY (Prosser 1998) ou de baclofen, un agoniste des récepteurs GABA_B (Biggs et Prosser 1999).

Il semble que l'intégration concomitante des facteurs photique et non-photiques par l'horloge circadienne principale relève de mécanismes complexes et difficiles à étudier et à interpréter. Cependant, l'étude des facteurs non-photiques a démontré que ces derniers pouvaient avoir un rôle à jouer dans le maintien et/ou l'établissement du caractère diurne ou nocturne. Il paraît alors raisonnable de penser que les interactions entre facteurs photique et non-photiques aient également un impact sur la diurnalité et la nocturnité. Dans la dernière partie de cette introduction, nous nous attacherons donc à décrire l'un des facteurs non-photiques et le système sous-jacent auquel il appartient, car son implication dans les mécanismes régulant les comportements diurnes et nocturnes pourrait bien se révéler fondamentale. Il s'agit de la sérotonine, déjà connue pour son implication dans la régulation de la veille et du sommeil (*Jacobs et Fornal 1999*) et donc au cœur de ce qui sépare nocturnité et diurnalité.

VI. Le système sérotonergique

La **sérotonine** a été découverte dans le sang au 19^{ème} siècle (*Rapport et al. 1948*). Le premier rôle attribué à cette molécule est d'induire une constriction des vaisseaux sanguins. En 1953, son rôle en tant que **neurotransmetteur** du système nerveux fût mis en évidence (*Twarog et Page 1953*). Depuis, il a été démontré que la 5-HT et plus généralement le système sérotonergique est impliqué(e) dans de très nombreuses fonctions, comme le sommeil, la douleur, la thermorégulation et la modulation des rythmes circadiens. Ce système est également impliqué dans divers troubles comprenant l'anxiété et la dépression.

1. Données anatomiques

a. Les noyaux sérotonergiques

Les noyaux contenant de la 5-HT sont compris dans la région bulbo-pontique et peuvent être séparés en deux groupes (*Jacobs et Azmitia 1992*).

- Le groupe postérieur (ou inférieur) comprend 3 noyaux du raphé : pallidus (B1), obscurus (B2) et magnus (B3), ainsi qu'une région mal définie de la medulla oblongata (B4).

- Le groupe antérieur (ou supérieur) est composé de 4 noyaux du raphé : médian [NRM ; partie pontique (B5) + partie mésencéphalique (B8)], dorsal [NRD ; partie pontique (B6) + partie mésencéphalique (B7)], linéaire (B8) et latéral (B9).

Le NRD est le noyau le plus riche en 5-HT (40%) et il est subdivisé en quatre régions : dorsomédiane, ventromédiane et deux régions latérales.

b. Afférences

Les noyaux du raphé reçoivent de nombreuses afférences originaires d'autres noyaux du tronc cérébral, comme les noyaux vestibulaires supérieurs, périhypoglossaux, du tractus solitaire, du locus coeruleus, de la substance noire, de l'aire tegmentale ventrale et de la substance grise périaqueducule (*Kalen et al. 1985*). Des afférences proviennent également de l'habénula latérale, du cortex préfrontal, de l'hypothalamus (aires préoptiques et latérales) et du thalamus (*Sakai et al. 1977*). Il est important de noter qu'une grande partie des afférences comprennent des interconnexions entre les différents noyaux du raphé, notamment entre NRM et NRD (*Mosko et al. 1977*).

c. Efférences

Les projections émanant du raphé sont séparées en deux voies principales.

- Les **projections descendantes** émanent des raphés postérieurs et projettent vers la moelle épinière. Elles sont organisées en deux voies (*Jacobs et Azmitia 1992*). La première voie, nommée **voie bulbospinale**, prend naissance dans les noyaux B1 et B4 et innerve les différentes parties de la moelle épinière. Son rôle serait notamment de **moduler les informations nociceptives** (*Ruda et al. 1982*). La deuxième voie, originaire du NRD, va moduler le locus coeruleus.
- Les **projections ascendantes** prennent naissance dans les raphés antérieurs et projettent vers le cerveau antérieur. La majorité de ces fibres ne sont pas myélinisées (*Azmitia et Gannon 1983*). Elles sont organisées en trois voies, **dorsale, médiale et ventrale** et se rejoignent plus rostralement, constituant une partie du faisceau médial du télencéphale. Ces trois voies innervent quasiment toutes les régions du cerveau mais de manière plus ou moins importante. Les principales régions innervées sont le bulbe olfactif, la région septale, l'hippocampe, le néostriatum, l'amygdale, le cortex cérébral, le thalamus (dont les IGL) et l'hypothalamus (*Azmitia et Segal 1978*). Dans cette dernière structure, nous avons déjà précisé que les SCN recevaient des afférences du NRM (*Meyer-Berstein et Morin 1996*).

2. Les neurones sérotonergiques

a. De la synthèse à la dégradation

La 5-HT est une amine biogène faisant partie des **indolamines**. Le précurseur de la synthèse de 5-HT est l'acide aminé **L-tryptophane** (L-Trp). Ce dernier est apporté par l'alimentation et rejoint le système nerveux central *via* des transporteurs. La voie de synthèse est composée de deux étapes (**Figure 14**) et se déroule dans les terminaisons présynaptiques. La première implique la **tryptophane hydroxylase** (TPH), l'**enzyme limitante** de cette voie de synthèse (*Lovenberg et al. 1967*), qui permet de transformer le L-Trp en 5-hydroxytryptophane (5-HTP). Le 5-HTP subit alors une décarboxylation rapide *via* la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) produisant la **5-hydroxytryptamine (5-HT) ou sérotonine**. La AADC n'est pas considérée comme limitante pour la biosynthèse de 5-HT. En effet, elle est fortement exprimée dans le cerveau et son activité enzymatique est 50 à 100 fois plus élevée que celle de la TPH. Il existe deux formes de TPH : TPH1 dans les tissus périphériques et TPH2 dans le système nerveux central.

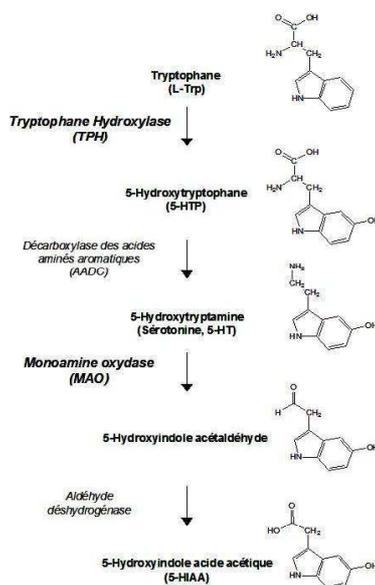


Figure 14 : Voies de biosynthèse et de dégradation de la sérotonine. Les enzymes intervenant dans ces voies sont indiquées en italique.

Une fois synthétisée, la 5-HT va être stockée dans des **vésicules de sécrétion** *via* le transporteur vésiculaire des monoamines. Dans ces vésicules, la 5-HT se lie à une protéine spécifique, la **SBP (serotonin binding protein)** formant le complexe 5-HT-SBP (*Gershon et al. 1983*). Une fois libérée dans la fente synaptique, le complexe se dissocie et la 5-HT peut se

fixer sur ses récepteurs. La 5-HT est ensuite éliminée de l'espace extracellulaire grâce à un **transporteur de recapture spécifique de la sérotonine (SERT)** situé sur des neurones sérotonergiques et non-sérotonergiques, ainsi que sur les cellule gliales (*Pickel et Chan 1999 ; Zhou et al. 1998*). Dans le milieu intracellulaire, la 5-HT est alors rapidement catabolisée en **5-hydroxyindole acide acétique (5-HIAA)** par l'action successive de deux enzymes, la monoamine oxydase (MAO) puis l'aldéhyde déshydrogénase.

b. Activité électrique

L'activité électrique des neurones à 5-HT est **lente et régulière** et possède une **composante intrinsèque** observée *in vivo* (*Aghajanian et Vandermaelen 1982*). De plus, lorsque le NRD est isolé de ses afférences, les neurones de cette structure continuent à présenter un lent profil d'activité rythmique (*Mosko et Jacobs 1977*).

De nombreux facteurs régulent l'activité électrique des neurones à 5-HT. Parmi eux, on retrouve la 5-HT elle-même, qui exerce son rôle régulateur *via* des auto-récepteurs 5-HT présynaptiques (voir VI. 3). D'autres neurotransmetteurs influent aussi sur cette activité de manière positive (noradrénaline et glutamate) ou négative (GABA, histamine et glycine).

Le **cycle veille-sommeil** est corélé à l'activité des neurones à 5-HT. En effet, chez le Chat, l'activité des neurones à 5-HT du NRD est lente et régulière pendant la **phase de veille** (*Trulson et Jacobs 1979*). Lors de l'entrée dans la phase de sommeil, cette activité décroît et perd sa rythmicité, jusqu'à **disparition** complète de l'activité une fois que l'animal entre en **sommeil paradoxal**. De plus, la libération de 5-HT est corrélée à l'activité électrique (maximale pendant la veille, minimale pendant le sommeil paradoxal). Ces résultats mettent en avant l'étroite relation qui lie le système sérotonergique au cycle veille-sommeil.

3. Les récepteurs sérotonergiques

Le système sérotonergique est sans aucun doute le système neurochimique possédant le plus grand nombre de sous-types de récepteurs différents. À ce jour, **15 gènes** codant pour ces récepteurs ont été clonés dans le cerveau des Mammifères (*Hoyer et Martin 1997*). **Sept différentes classes** ont été mises en évidence et l'on peut les répartir en 5 groupes. Le premier groupe comprend les **récepteurs 5-HT₃** (5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E}), seul groupe représentant la famille des **récepteurs ionotropiques (récepteurs canaux)**. Les autres groupes sont tous formés de **récepteurs métabotropiques (récepteurs couplés aux protéines G)** que l'on distingue en fonction du système principal de seconds messagers qu'ils activent :

- Groupe couplé aux protéines $G\alpha_i/G\alpha_o$: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}.
- Groupe couplé aux protéines $G\alpha_q$: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}.
- Groupe couplé aux protéines G_s : 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} et 5-HT_{7D}.
- Groupe dont le couplage est incertain : 5-HT_{5A} et 5-HT_{5B}.

De plus, l'épissage alternatif, l'édition de l'ARNm et les modifications post-traductionnelles augmentent encore la diversité des récepteurs métabotropiques à la sérotonine.

a. Les récepteurs 5-HT_{1A}

Les **récepteurs 5-HT_{1A}** sont très largement distribués dans tout le système nerveux central (*Lanfumey et Hamon 2004*). En fonction des structures, ils peuvent être **présynaptiques** (auto-récepteurs) ou **postsynaptiques** :

- Les **auto-récepteurs présynaptiques** sont essentiellement localisés dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones 5-HT du **NRD**, et du **NRM** (*Riad et al. 2000 ; Sotelo et al. 1990*). Ils agissent en **inhibant l'activité électrique** (*Sprouse et Aghajanian 1986*), la **synthèse** (*Hillegaart et al. 1990*) et la **libération de 5-HT** (*Hjorth et Sharp 1991*).
- Les **récepteurs postsynaptiques** ont été caractérisés dans de nombreuses structures cérébrales, comme l'hippocampe, le septum, l'amygdale, le cortex et les **SCN**. Ils seraient notamment impliqués dans l'inhibition de la potentialisation à long-terme, la neurogenèse, la réduction de la longueur des dendrites et du nombre d'épines dendritiques ainsi que dans la **régulation de la synchronisation de l'horloge circadienne principale** (*Bockaert et al. 2006*).

La voie de transduction intracellulaire principale activée par les récepteurs 5-HT_{1A} **inhibe l'AMPC** (*De Vivo et Maayani 1986 ; Weiss et al. 1986 ; Figure 15*). Cependant les récepteurs 5-HT_{1A} situés dans le NRD ne semblent pas être couplés à cette voie (*Bockaert et al. 2006*). D'autres voies peuvent également être activées (*Raymond et al. 2001 ; Figure 15*). L'agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} le plus utilisé à l'heure actuelle est le **8-OH-DPAT** ou son énantiomère positif le **(+)8-OH-DPAT**. Cependant ces deux agonistes ont également une affinité pour le récepteur 5-HT₇ bien qu'elle soit plus faible. Il existe également certaines molécules qui jouent un rôle d'agoniste/antagoniste mixte comme le NAN-190, le BMY7378 et le S15535. Ces substances agiraient comme agoniste partiel au niveau présynaptique et comme antagoniste au niveau postsynaptique. Le **WAY-100635** est l'antagoniste ayant la plus grande spécificité pour les récepteurs 5-HT_{1A} à l'heure actuelle.

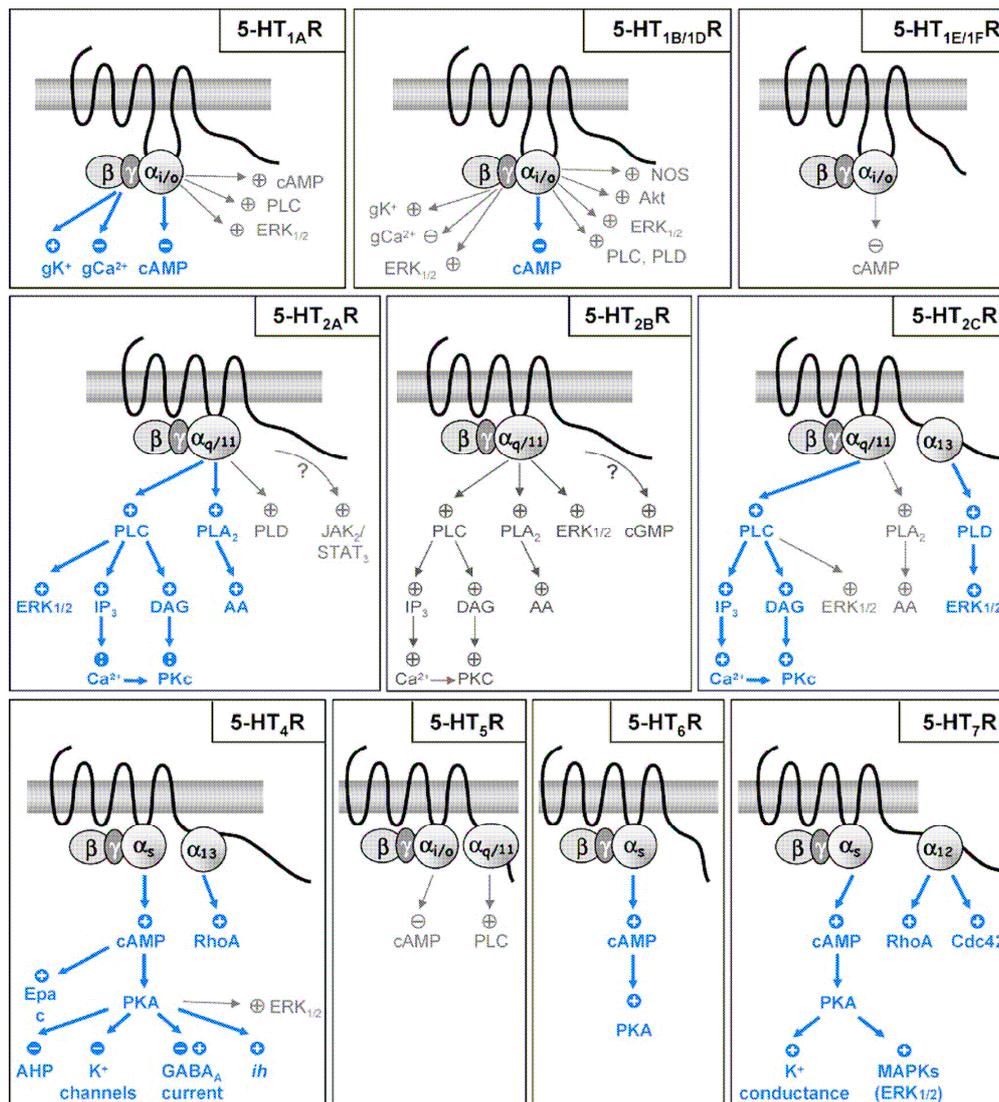


Figure 15 : Voies de signalisation intracellulaire et effecteurs des récepteurs 5-HT (en bleu dans les neurones, en gris dans les lignées cellulaires transfectées).

(D'après Bockaert et al. 2006)

b. Les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D}

Les **récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D}** ont une large part d'homologie de séquence. Mais alors que les récepteurs 5-HT_{1B} sont très largement présents dans plusieurs structures cérébrales (cortex frontal, striatum et SCN), les récepteurs 5-HT_{1D} sont faiblement exprimés dans le système nerveux central, dont le NRD, les ganglions trigéminaux, le striatum et le cortex frontal (Bockaert et al. 2006 ; Hou et al. 2001 ; Roberts et Price 2001).

Ces deux types de récepteurs ne sont pas situés dans les corps cellulaires mais dans les **terminaisons présynaptiques** des neurones à 5-HT (auto-récepteurs) et des neurones à dopamine, GABA et glutamate (hétéro-récepteurs). Ils ont un **rôle inhibiteur de la libération**

des neurotransmetteurs (Pauwels 1997, Riad et al. 2000 ; Sari et al. 1997 ; Starke et al. 1989). Dans les SCN de Souris, ils permettraient l'inhibition de la libération de glutamate provenant du RHT, mais également celle de GABA dans les cellules des SCN (Bramley et al. 2005 ; Pickard et al. 1999) aboutissant à une **régulation des mécanismes de synchronisation**. Les études pharmacologiques et génétiques suggèrent que les récepteurs 5-HT_{1B} seraient aussi impliqués dans les troubles obsessionnels compulsifs, la dépression, le sommeil et le développement axonal (Bockaert et al. 2006).

Ces deux types de récepteurs sont **négativement couplés à l'AC**, mais d'autres voies de transduction ont été caractérisées (Raymond et al. 2001 ; **Figure 15**). Les propriétés pharmacologiques des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} sont légèrement différentes. Le **TFMPP** et le **pindolol** sont respectivement agoniste et antagoniste des récepteurs 5-HT_{1B} mais ils présentent une affinité pour les autres récepteurs 5-HT₁. Pour les récepteurs 5-HT_{1D}, on peut citer l'agoniste **PNU 109291** et l'antagoniste spécifique **BRL 15572**. Il existe également une classe d'agonistes 5-HT_{1B/1D}, les triptans, qui sont des antimigraineux.

c. Les récepteurs 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}

Ces deux sous-types de récepteurs sont présents dans le cerveau, mais peu de données sont disponibles en ce qui concerne leur localisation. Les récepteurs 5-HT_{1F} ont notamment été mis en évidence, au niveau **présynaptique**, dans le nerf trigéminal et seraient impliqués en plus des récepteurs 5-HT_{1B/1D} dans les effets des triptans (Lanfumeij et Hannon 2004). Un **couplage négatif à l'AC** a été démontré dans des cellules hétérologues, mais pas dans les neurones (Raymond et al. 2001 ; **Figure 15**).

d. Les récepteurs 5-HT_{2A}

Les **récepteurs 5-HT_{2A}** sont distribués dans de nombreuses structures, comme le cortex préfrontal où ils sont particulièrement abondants et également dans les ganglions de la base, la moelle épinière et les **SCN**. Leur localisation a été particulièrement étudiée dans le cortex préfrontal (Bockaert et al. 2006). On les trouve notamment dans le soma, les dendrites et les axones des cellules pyramidales. Ils ont été mis en évidence aux niveaux **pré- et postsynaptiques**. Ils semblent être impliqués dans des désordres mentaux, comme la dépression et la schizophrénie (Kroeze et Roth, 1998). Ils sont probablement le site d'action des hallucinogènes, dont le LSD (Aghajanian et Marek 1999). Leur rôle dans la rythmicité circadienne est pour le moment inconnu.

Ils sont couplés à l'**activation de la PLC**, mais peuvent également activer d'autres voies (Raymond et al. 2001 ; **Figure 15**). Il n'existe pas d'agoniste spécifique pour cette classe, mais seulement des agonistes spécifiques aux récepteurs 5-HT₂, comme le **DOI**. En revanche, il existe un antagoniste spécifique, le **MDL 100907**. De manière surprenante, certains antagonistes moins spécifiques (miansérine, spiperone, mesergoline), administrés de manière chronique, induisent une désensibilisation et une internalisation des récepteurs 5-HT_{2A}, *in vivo* et *in vitro* (Roth et Ciaranello 1991 ; Sanders-Bush 1990).

e. Les récepteurs 5-HT_{2B}

Ce sous-type de récepteur a été localisé dans quelques régions cérébrales : le cervelet, le septum latéral, l'hypothalamus dorsal et l'amygdale médiale. Le rôle de ces récepteurs reste méconnu. Il active la **voie de la PLC** ainsi que d'autres voies de signalisation (Raymond et al. 2001 ; **Figure 15**). Un agoniste spécifique (**BW 723C86**), ainsi qu'un antagoniste spécifique (**SB 200646**) sont disponibles pour ce sous-type de récepteur.

f. Les récepteurs 5-HT_{2C}

Les **récepteurs 5-HT_{2C}** ont été les premiers récepteurs sérotonergiques clonés (Loric et al. 1992). C'est le seul récepteur métabotropique de type 5-HT connu pour être régulé par édition. Sept isoformes différentes ont été caractérisées chez le Rat. Ces récepteurs sont exprimés majoritairement dans le plexus choroïdien, participant au contrôle de la production du liquide céphalo-rachidien, mais on les retrouve également dans les ganglions de la base, l'hippocampe, l'hypothalamus et particulièrement dans les **SCN** où ils interviennent dans la **régulation de la synchronisation**. Ce sous-type de récepteur peut être pré- ou postsynaptique.

Comme les autres récepteurs 5-HT₂, la voie de transduction principale activée est celle de la **PLC**, bien que d'autres voies aient été caractérisées (McGrew et al. 2002 ; Raymond et al. 2001 ; **Figure 15**). Un agoniste (**WAY-161503**) et un antagoniste (**SB 242084**), tous deux spécifiques, sont disponibles. Certains agonistes provoquent une désensibilisation et une internalisation de ce récepteur lors d'injections chroniques (Schlag et al. 2004).

g. Les récepteurs 5-HT₃

Contrairement aux autres récepteurs sérotonergiques, ce sous-type de récepteur appartient à la famille des **récepteurs ionotropiques**. Leur structure est celle de **canaux cationiques non-spécifiques** (Na⁺, Ca²⁺ et K⁺) ayant les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que les

canaux nicotiques et GABA_A (Boess et Martin 1994). Cinq différents variants de récepteurs 5-HT₃ ont été mis en évidence (5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E}), mais pour les trois derniers, aucune étude fonctionnelle n'a encore été réalisée (Boess et al. 1995 ; Niesler et al. 2003). Le récepteur 5-HT_{3A} est présent sous la forme de deux variants (un long et un court) ayant une distribution, une pharmacologie et des caractéristiques électrophysiologiques similaires (Miquel et al. 1995). La distribution du récepteur 5-HT_{3B} semble par contre différente de celle du récepteur 5-HT_{3A} (Morales et Wang 2002). Une **combinaison hétérodimérique**, composée de sous-unités **5-HT_{3A} et 5-HT_{3B}**, semble être nécessaire pour que les récepteurs soient pleinement fonctionnels. En effet, les récepteurs formés d'homodimères de chaque sous-unité ont une faible conductance et provoquent des réponses de basse amplitude (Dubin et al. 1999).

Les récepteurs 5-HT₃ ont été mis en évidence dans de nombreuses structures cérébrales incluant l'hippocampe, le noyau accumbens, l'amygdale, le noyau dorsal moteur du tractus solitaire et l'area postrema. Localisés au niveau présynaptique, leur activation induit un courant cationique entrant provoquant une rapide dépolarisation des neurones, ce qui **favorise la libération de neurotransmetteurs**. Ces effets ont été observés pour la NA dans l'hippocampe (Feuerstein et Hertting 1986), la dopamine (DA) dans le noyau accumbens et l'amygdale (De Deurwaerdere et al. 1998), le GABA dans la moelle épinière (Kawamata et al. 2003) et le glutamate dans l'area postrema (Funahashi et al. 2004). Il existe un agoniste (**m-CPBG**) et un antagoniste (**ondansetron**) hautement spécifiques.

h. Les récepteurs 5-HT₄

Les **récepteurs 5-HT₄** sont soumis à l'épissage alternatif et à ce jour dix variants fonctionnels ont été caractérisés (Bender et al. 2000 ; Hiroi et al. 2001). Cependant, le rôle fonctionnel d'un tel nombre d'isoformes reste à élucider. La pharmacologie de ces variants semble être similaire, contrairement à leur distribution. Ils sont présents dans l'hypothalamus, le noyau accumbens, l'amygdale, le bulbe olfactif, l'hippocampe, la substance noire et le septum. Ils seraient localisés au niveau **présynaptique** permettant **l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs** (acétylcholine, DA, 5-HT, GABA). On les trouve également au niveau **postsynaptique**. Ils interviendraient dans la potentialisation à long-terme et modèleraient l'activité du NRD, l'apprentissage, la mémoire, les phénomènes de récompense, et le stress. Ces récepteurs activent de nombreuses voies de transduction, la principale étant celle **couplée positivement à l'AC (Figure 15)**. De nombreux ligands spécifiques sont disponibles pour ces récepteurs, comme le BIMU 8, un agoniste et le GR113808, un antagoniste.

i. Les récepteurs 5-HT₅

Deux sous-types de **récepteurs 5-HT₅** (5-HT_{5A} et 5-HT_{5B}) ont été trouvés chez les rongeurs. Ils ont été localisés dans l'hypothalamus incluant les **SCN**, l'hippocampe, la fimbria, le corps calleux et la paroi des ventricules cérébraux. En fonction de la structure cérébrale, ils sont présents dans les astrocytes ou les neurones (agissant alors comme auto-récepteurs).

Ces récepteurs seraient **couplés négativement à l'AC**, mais aucune étude n'a identifié ce couplage dans des cellules neuronales (**Figure 15**). Il n'existe pas d'agoniste et d'antagoniste spécifiques pour ces récepteurs. On peut citer le **5-CT** comme agoniste non spécifique et la **ritansérine** comme antagoniste non spécifique.

j. Les récepteurs 5-HT₆

Ces récepteurs sont fortement exprimés dans les régions limbiques et corticales, mais aussi dans le bulbe olfactif et le striatum. Dans ces différentes régions, ils ne sont pas exprimés dans les neurones sérotonergiques, mais essentiellement dans les neurones GABAergiques. Ces récepteurs auraient des rôles possibles dans les désordres psychotiques et affectifs, l'anxiété, l'épilepsie, et la mémoire.

Il n'y a à ce jour qu'une seule voie de transduction activée par ces récepteurs, celle **couplée positivement à l'AC** (**Figure 15**). Alors qu'il existe un antagoniste spécifique (**SB 271046**), aucun agoniste spécifique n'est pour le moment disponible.

k. Les récepteurs 5-HT₇

Il existe quatre variants pour les **récepteurs 5-HT₇** (5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} et 5-HT_{7D}; *Heidmann et al. 1997*) mais leur pharmacologie, leur voie de transduction et leur distribution semblent être similaires (*Jasper et al. 1997*). On les trouve dans les **SCN**, le thalamus, le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, le cervelet, le colliculus supérieur et les noyaux du raphé. Ils seraient plutôt **postsynaptiques** (*Clemett et al. 1999*) et majoritairement situés dans les **neurones GABAergiques**. Ils interviendraient dans la thermorégulation, l'activation du sommeil paradoxal, l'apprentissage, la mémoire, le contrôle de la libération hormonale et dans la **régulation de la synchronisation de l'horloge circadienne principale**.

Les récepteurs 5-HT₇ sont **couplés positivement à l'AC**, mais encore une fois d'autres voies de signalisation ont été mises en évidence (**Figure 15**). Jusqu'à très récemment, aucun agoniste spécifique n'était disponible et le 8-OH-DPAT et son énantiomère positif étaient très utilisés (malgré leur affinité plus forte pour les récepteurs 5-HT_{1A}). Cependant, un agoniste

spécifique (**AS19**) est maintenant disponible. Il existe aussi un antagoniste spécifique, le **SB 269970**.

4. Contrôle circadien du système sérotonergique

a. Tryptophane hydroxylase et rythmicité circadienne

L'enzyme limitante de la synthèse de 5-HT dans le cerveau, la **TPH2**, est sous contrôle circadien. En effet chez des Rats placés en DD, le **niveau d'ARNm** de cette enzyme est rythmique dans le **NRD** et le **NRM** avec une **valeur maximale en fin de jour subjectif** (*Malek et al. 2005*). Il existe également des variations circadiennes du niveau de la **protéine TPH2** dans ces mêmes structures, qui présentent un **maximum en milieu de nuit subjective** (*Malek et al. 2004*). Cette rythmicité est également observée dans les **SCN** (*Barassin et al. 2002*) et les **IGL** (*Malek et al. 2004*), avec un décalage, puisque le pic du niveau de **protéine** a lieu en **fin de jour subjectif**. Il semblerait donc que la TPH2 soit d'abord exprimée dans le NRD et le NRM, pour être ensuite transportée à travers les axones jusqu'aux terminaisons situées dans les SCN et les IGL.

Les données qui concernent la rythmicité journalière de l'activité enzymatique de la TPH sont par contre contradictoires. Alors qu'une étude démontre un rythme d'activité enzymatique avec des valeurs maximales en milieu de jour (*Kan et al. 1977*), d'autres travaux ont mis en évidence une absence de rythmicité (*McLennan et Lees 1978*). Il n'est donc pas possible de conclure quant à la rythmicité circadienne de l'activité enzymatique de la TPH.

Les mécanismes qui permettent le contrôle rythmique de la synthèse de TPH2 impliquent le **rythme de corticostérone** plasmatique (*Malek et al. 2007*). En effet des animaux adrénalectomisés ne présentent plus de variations des niveaux d'ARNm de *Tph2*. De plus quand on restaure artificiellement le rythme de corticostérone, cela restaure également la rythmicité de l'expression de *Tph2*. L'activité locomotrice serait également capable d'influer sur l'expression de *Tph2* (*Malek et al. 2007*). **Ce sont donc des sorties rythmiques de l'horloge qui viendraient réguler le fonctionnement circadien de la TPH2 et donc de la 5-HT dans les noyaux du raphé.**

b. Sérotonine et rythmicité circadienne

Les variations de la quantité de sérotonine contenue dans le cerveau entier sont connues depuis longtemps et présentent des valeurs maximales pendant le jour chez le Rat (*Quay 1968*). Ce n'est que plus récemment que des données ont été obtenues dans les **SCN**

concernant le contenu en 5-HT et son métabolite la 5-HIAA (Poncet et al. 1993). Chez le Rat, le rythme de **5-HT** présente des **valeurs maximales en fin de nuit** suivies trois heures plus tard d'un pic de 5-HIAA. De plus, la technique de microdialyse a permis de détecter une rythmicité de la **libération de 5-HT dans les SCN** du Hamster syrien (Dudley et al. 1998) et du Rat (Barassin et al. 2002) avec des **valeurs maximales en début de nuit subjective**. Le même type de rythmicité a été trouvée dans les **IGL** du Hamster syrien (Grossman et al. 2004). Par contre, aucune donnée n'est disponible pour les SCN des animaux diurnes. Les pics de contenu et de libération de 5-HT surviennent quelques heures après celui de la TPH2, suggérant que le rythme de la TPH2 contrôle la rythmicité de la 5-HT.

Le rôle de la libération rythmique de 5-HT dans les SCN et les IGL reste méconnu. Etant donné que dans les SCN et IGL des espèces nocturnes, la sérotonine présente des valeurs maximales pendant la nuit, moment où ces animaux sont actifs, **le rythme de sérotonine pourrait indiquer à l'horloge circadienne principale que les animaux sont en phase de veille**. Cependant, comme nous allons le voir maintenant, la sérotonine a d'autres rôles dans les SCN à la fois pendant le jour et la nuit.

5. Rôle de la sérotonine dans les rythmes circadiens

a. Récepteurs sérotonergiques

Un grand nombre de sous-types de récepteurs sérotonergiques sont exprimés à la surface de la membrane plasmique des cellules des SCN, dont la nature varie légèrement en fonction de l'espèce étudiée. Nous ne citerons ici que les données obtenues chez le Hamster syrien, la Souris et le Rat (**Tableau 2**), espèces les plus étudiées dans le cadre de la régulation sérotonergique des SCN. Encore une fois, aucune donnée n'est disponible chez les rongeurs diurnes.

Recepteurs	Rat	Hamster syrien	Souris
5-HT _{1A}	Oui ^a	Oui ^b	Oui ^c
5-HT _{1B}	Oui ^d	Oui ^e	Oui ^f
5-HT _{2A}	Oui ^g	?	?
5-HT _{2C}	Oui ^g	?	?
5-HT ₃	?	?	?
5-HT _{5A}	Oui ^h	Oui ⁱ	?
5-HT ₇	Oui ^j	Oui ^a	Oui ^f

Tableau 2. Localisation des sous-types de récepteurs 5-HT dans les SCN observée par autoradiographie et immunohistochimie.

La présence des récepteurs 5-HT_{1A} dans les SCN de rat n'a pas été décrite, par contre il existe des données pour l'ARNm codant pour ce récepteur.

?=Inconnu. Références a) Wright et al. 1995 ; b) Duncan et al. 1999; c) Bonaventure et al. 2002; d) Manrique et al. 1994; e) Pickard et al. 1999; f) Belenky et Pickard 2001; g) Moyer et Kennaway 1999; h) Oliver et al. 2000; i) Duncan et al. 2000; j) Neumaier et al. 2001.

Il apparaît que la majorité des récepteurs sérotonergiques trouvés chez une espèce sont retrouvés chez les deux autres, hormis pour les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}, uniquement localisés chez le Rat à ce jour, ainsi que pour la présence des récepteurs 5-HT_{5A} dans les SCN de Souris, non étudiés pour le moment. Le cas du récepteur 5-HT₃ est particulier, car des études (voir VI. 5. c.) montrent que son activation entraîne des effets sur l'horloge, mais aucun résultat n'a pour le moment mis en évidence leur présence dans les SCN. Bien que tous ces récepteurs soient présents dans les SCN, la majorité des études n'indiquent pas ou rarement si ces récepteurs sont pré- ou postsynaptiques et ne précisent pas sur quels types de neurones ils sont exprimés.

De plus, dans les structures participant à la modulation sérotonergique de l'horloge (NRD, NRM, IGL), directement ou indirectement, on trouve également des récepteurs 5-HT, comme les récepteurs 5-HT_{1A} (agissant comme auto-récepteurs) ou les récepteurs 5-HT₇ (Bonaventure et al. 2002 ; Chalmer et Watson 1991 ; Duncan et Hensler 2002).

b. Chez le Hamster syrien et la Souris

Les différentes études menées chez le Hamster syrien et la Souris ont montré que le système sérotonergique agissait sur les SCN de manière similaire chez ces deux espèces nocturnes.

L'étude des **lésions des fibres 5-HT**, par l'application d'une neurotoxine, le **5,7-DHT** (5,7-dihydroxytryptamine), a fourni quelques indices quant au rôle de ce système. Chez le Hamster syrien, l'absence de ces fibres provoque un **allongement de la période d'activité** en LD et en

DD (*Meyer-Berstein et al. 1997 ; Smale et al. 1990*). En LL, l'allongement de la période endogène normalement observée disparaît chez des animaux ayant subi une lésion des noyaux du raphé (*Meyer-Berstein et al. 1997*). Chez la Souris, la lésion des fibres 5-HT **bloque les avances de phase** de l'activité locomotrice observées en milieu de jour, lors de l'accès à une nouvelle roue (*Edgar et al. 1997*). Au vu de ces résultats, **le système sérotonergique fournirait des informations aux SCN permettant la modulation de l'activité locomotrice**. Les nombreuses études pharmacologiques, menées chez le Hamster syrien et la Souris, ont mis en évidence deux rôles principaux du système sérotonergique sur l'horloge qui sont de type non-photique.

Premièrement, **les agonistes 5-HT produisent des avances de phases de l'activité locomotrice ainsi qu'une diminution transitoire de la transcription de *Per1* et *Per2* dans les SCN quand ils sont injectés en milieu de jour subjectif de manière systémique ou localement** (*Caldelas et al. 2005 ; Challet et al. 1998 ; Cutrera et al. 1994 ; 1996 ; Ehlen et al. 2001 ; Horikawa et al. 2000 ; Horikawa et Shibata 2004 ; Mendoza et al. 2008*). *In vitro*, la **fluoxétine, un inhibiteur de recapture de la sérotonine** utilisé dans le traitement de la **dépression**, produit des **avances de phase** de l'activité électrique des SCN (*Prosser et al. 2006*). Ces effets sont donc de type **non-photique**, comme ceux observés avec l'accès à une nouvelle roue ou une injection de NPY. Les agonistes les plus utilisés pour observer ces effets sont le **8-OH-DPAT** et le **(+)8-OH-DPAT**, tous deux agonistes des récepteurs 5-HT_{1A/7}. L'implication d'un seul de ces deux récepteurs est hautement controversée. En effet, d'une part, certaines études mettent en avant **l'implication du récepteur 5-HT_{1A}**, puisque des antagonistes de ce récepteur (pindolol) bloquent les effets de déphasages observés après injection de 8-OH-DPAT (*Tominaga et al. 1992*). De plus, les Souris mutantes pour ce récepteur ne présentent plus de déphasage en réponse au 8-OH-DPAT (*Smith et al. 2008*). D'autre part, **les récepteurs 5-HT₇ seraient également impliqués**, car des antagonistes de ce récepteur (DR4004 ou SB269970) bloquent les effets du 8-OH-DPAT (*Duncan et al. 2004 ; Ehlen et al. 2001*) et les Souris mutantes pour le récepteur 5-HT₇ ne présentent plus de déphasage en réponse à cet agoniste (*Gardani et Biello 2008*). Ces résultats suggèrent fortement que **ces deux récepteurs sont indispensables** afin d'observer les effets non-photiques du système sérotonergique sur l'horloge. De plus, une stimulation électrique des NRD ou des NRM provoque une libération de 5-HT aboutissant à des avances de phase de l'activité locomotrice (*Meyer-Berstein et Morin 1999*). Des injections de 8-OH-DPAT dans les IGL ou le NRD induisent également des avances de phases (*Challet et al. 1998 ; Duncan*

et al. 2004). Le NRD, le NRM et les IGL seraient donc également impliqués dans les effets non-photiques.

Deuxièmement, le système sérotonergique est également capable de moduler la synchronisation photique de l'horloge. En effet, les injections systémiques ou locales de 8-OH-DPAT précédant un créneau de lumière inhibent à la fois les retards et les avances de phase de l'activité locomotrice normalement induits par la lumière (Rea et al. 1994 ; Weber et al. 1998 ; Figure 16), ainsi que l'expression de FOS dans les SCN (Glass et al. 1994 ; Rea et al. 1994).

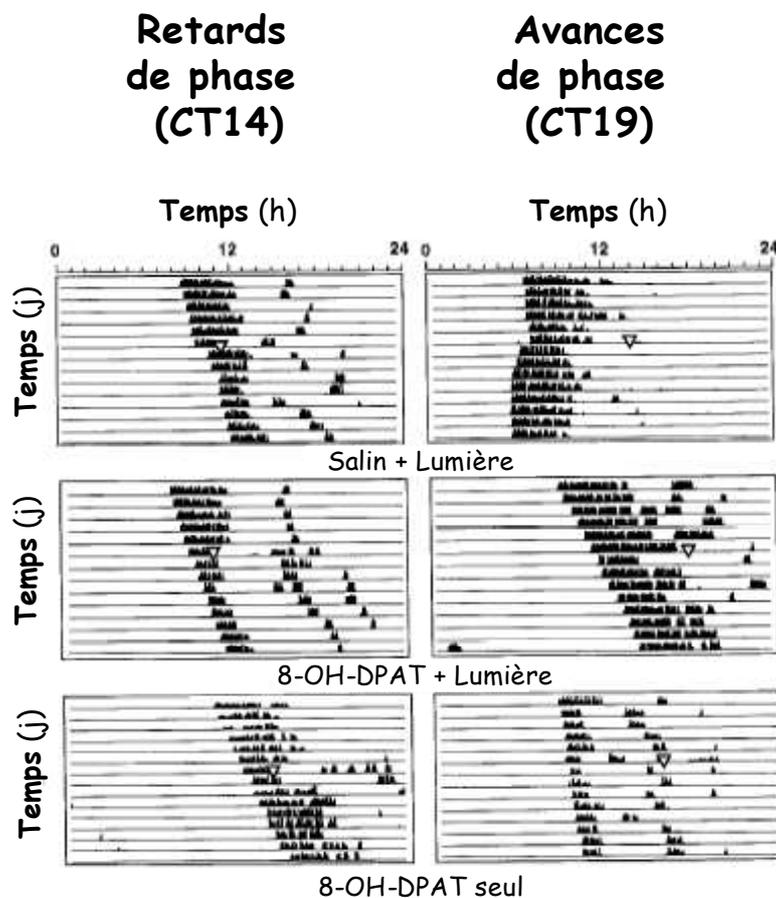


Figure 16 : Modulation sérotonergique des déphasages de l'activité locomotrice induits par des créneaux lumineux en début (CT14) ou fin (CT19) de nuit subjective chez le Hamster syrien.

En haut sont représentés les déphasages induits par la lumière. Au milieu, on observe l'inhibition des déphasages après injection de 8-OH-DPAT. En bas, on remarque que le 8-OH-DPAT n'a pas d'effet quand il est injecté seul. Les triangles représentent le moment où le traitement est appliqué.

(D'après Rea et al. 1994)

Chez la Souris, il semble cependant que le 8-OH-DPAT ne soit pas aussi efficace que chez le Hamster syrien (Antle *et al.* 2003). D'autres substances provoquent également des effets *in vivo*, au niveau de l'activité locomotrice et électrique, et de l'expression de FOS, comme la **5-HT** elle-même, la **quipazine** et le **5-CT** (deux agonistes 5-HT non spécifiques ; Rea *et al.* 1994 ; Selim *et al.* 1993 ; Ying *et Rusak* 1994 ; 1997), ainsi que la **fluoxétine** (Challet *et al.* 2001 ; Gannon *et Millan* 2007). Ces effets seraient en partie dûs aux **récepteurs 5-HT_{1A}** (Gannon 2003 ; Mistleberger *et Antle* 1998 ; Smith *et al.* 2008 ; Ying *et Rusak* 1994), mais également aux **récepteurs 5-HT₇** (Gardani *et Biello* 2008 ; Ying *et Rusak* 1997). Les **récepteurs 5-HT_{1B}** y participeraient également, puisque par exemple, des agonistes (TFMPP) de ce récepteur inhibent les déphasages de l'activité locomotrice et de l'activité électrique des SCN induits respectivement par la lumière ou par une stimulation du nerf optique chez le Hamster syrien et la Souris (Pickard *et al.* 1996 ; 1999 ; Pickard *et Rea* 1997 ; Smith *et al.* 2001 ; Srkalovic *et al.* 1994). De manière surprenante, les réponses à la lumière sont réduites chez les Souris mutantes 5-HT_{1B} (Sollars *et al.* 2006). Ces effets seraient dûs à la localisation d'une partie des récepteurs 5-HT_{1B} sur les neurones GABAergiques des SCN (Bramley *et al.* 2005).

Hormis les deux effets principaux que nous venons d'énoncer, certains composés particuliers (**NAN-190**, **BMY7378** **S15535**, **MKC-242**) sont capables de **potentialiser les déphasages** de l'activité locomotrice induits par la lumière (Byku *et Gannon* 2000 ; Gannon 2003 ; Gannon *et Millan* 2006 ; Matsuda *et al.* 1995 ; Rea *et al.* 1995 ; Sterniczuk *et al.* 2008 ; Takahashi *et al.* 2002). La plupart de ces composés agiraient comme agonistes des autorécepteurs 5-HT_{1A} situés dans le raphé et comme antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques situés dans les SCN. Cet effet mixte causerait une **forte diminution de la quantité de 5-HT présente dans les SCN** (Dudley *et al.* 1998), aboutissant à la potentialisation des déphasages.

c. Chez le Rat

La situation, beaucoup plus complexe chez le Rat, met en exergue **un paradoxe** en ce qui concerne la modulation sérotonergique de l'horloge circadienne principale chez les rongeurs nocturnes. Une seule étude montre que la **quipazine** (un agoniste 5-HT non spécifique) et le **8-OH-DPAT** provoquent des **avances de phase** de l'activité locomotrice quand ils sont injectés en **milieu de jour** subjectif (Edgar *et al.* 1993). Ce résultat indique donc que la 5-HT agirait de manière **non-photique** chez le Rat, comme chez le Hamster syrien et la Souris. Cependant, il s'agit du seul résultat de ce type obtenu chez le Rat *in vivo*, alors qu'une multitude de données mettent en avant un autre rôle de la modulation sérotonergique des SCN

chez cette espèce. En effet, pendant la nuit subjective, des injections systémiques et locales d'agonistes non spécifiques, comme la **quipazine** ($5\text{-HT}_3 > 5\text{-HT}_{1A} > 5\text{-HT}_{1B}$), le **DOI** ($5\text{-HT}_{2A} > 5\text{-HT}_{2C} > 5\text{-HT}_{2B}$), le **mCPP** ($5\text{-HT}_{2C} > 5\text{-HT}_{2B} > 5\text{-HT}_{2A} > 5\text{-HT}_1$) et le **mCPBG** (un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT_3) provoquent des **déphasages de l'activité locomotrice similaires à ceux observés en réponse à la lumière** (Graff et al. 2005 ; 2007 ; Kalkowski et Wollnik 1999 ; Kennaway et al. 1996 ; Kennaway et Moyer 1998 ; Kohler et al. 1999 ; **Figure 17**). De plus, la plupart de ces composés induisent une **augmentation** de l'expression des gènes *Per1* et *Per2*, et de la protéine **FOS** dans les SCN, ce qui est identique aux effets produits par la lumière pendant la nuit subjective (Graff et al. 2007 ; Varcoe et al., 2003 ; Varcoe et Kennaway 2008). On parle alors d'effets de **type photique** ou « *photic-like* » pour cette modulation sérotonergique particulière qui mime la synchronisation photique.

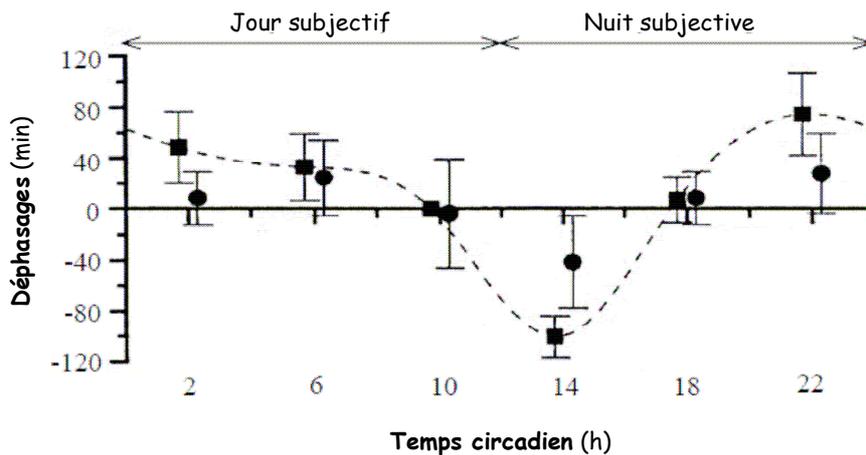


Figure 17 : Courbe de réponse de phase pour la quipazine chez le Rat.

Les déphasages sont représentés par des carrés pour la quipazine et par des ronds pour le témoin (NaCl).

(D'après Kohler et al. 1999).

Il semble que deux sous-types de récepteurs 5-HT soient impliqués dans ces effets. Le premier est le **récepteur 5-HT_{2C}** . En effet, les effets induits par des injections de DOI sont bloqués par des pré-traitements utilisant des antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT_{2C} (Kennaway et al. 2001) qui sont présents dans les SCN du Rat (et dont la présence n'a pas été déterminée chez le Hamster syrien et la Souris). Le deuxième récepteur potentiellement impliqué dans ces effets est le **récepteur 5-HT_3** , puisque des injections d'agonistes spécifiques de ce sous-type de récepteur (mCPBG) provoquent également des déphasages

photic-like (Graff *et al.* 2007). Cependant, les récepteurs 5-HT₃ n'ont, à ce jour, pas été directement identifiés dans les SCN chez le Rat et les autres rongeurs nocturnes.

De manière surprenante, peu d'études portent sur la modulation sérotonergique de la synchronisation photique chez le Rat. On peut citer que l'induction de FOS en réponse à la lumière, normalement réduite par des traitements au 8-OH-DPAT chez le Hamster syrien (Glass *et al.* 1994 ; Rea *et al.* 1994), ne l'est que faiblement chez le Rat (Recio *et al.* 1996).

Alors que les données *in vivo* impliquent majoritairement le système sérotonergique dans une modulation de type **photique** chez le Rat, les résultats obtenus *in vitro* chez cette espèce impliquent ce système dans une modulation de type **non-photique**. Des infusions de **5-HT**, de **quipazine**, de **5-CT**, de **8-OH-DPAT** et de **fluoxétine**, réalisées sur des tranches hypothalamiques en **milieu de jour subjectif**, provoquent des **avances de phase** de l'activité électrique des SCN (Medanic et Gillette 1992; Prosser *et al.* 1990 ; 1993 ; 2006; Shibata *et al.* 1992 ; Sprouse *et al.* 2006). Ces effets n'étant pas inhibés après application de TTX (Prosser *et al.* 1992), connue pour bloquer la transmission synaptique, on peut supposer que les effets de ces composés sérotonergiques sont dûs à l'activation de récepteurs postsynaptiques. Les **récepteurs 5-HT₇** seraient responsables de ces effets non-photiques observés *in vitro* (Sprouse *et al.* 2005), mais on ne peut exclure une implication possible des **récepteurs 5-HT_{1A}**. De plus, les **récepteurs 5-HT_{5A}** pourraient également participer à ces effets (Sprouse *et al.* 2004).

Le système sérotonergique qui projette massivement vers les SCN est contrôlé à différents niveaux par le système circadien. En retour, la sérotonine libérée dans les SCN a des effets complexes et multiples sur le fonctionnement de l'horloge circadienne principale. Cela est dû à la multitude de sous-types de récepteurs 5-HT présents dans cette structure. De plus, le type d'effet semble dépendant de l'espèce ainsi que de l'heure circadienne. On peut alors se demander de quelle manière agit le système sérotonergique chez les espèces diurnes.

CHAPITRE 2 - OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'horloge circadienne principale située dans les SCN génère des rythmes circadiens (environ 24 h). Une des propriétés fondamentales de l'horloge est sa capacité à être synchronisée par différents facteurs, le plus puissant d'entre eux étant le cycle lumière/obscurité. Le système sérotonergique semble être un autre composant clé dans la synchronisation des SCN. De plus la sérotonine joue un rôle important dans les mécanismes régulant le cycle veille/sommeil qui se trouvent être en opposition de phase entre animaux diurnes et nocturnes. L'étude de la modulation sérotonergique de l'horloge semble donc être indispensable pour tenter de décrypter ce qui régit l'établissement et/ou le maintien des caractères diurne et nocturne.

Pour réaliser ce décryptage, le but de la **première partie de cette thèse** a été de valider la diurnalité d'un rongeur qualifié de « crépusculaire », *Arvicanthis ansorgei* (Arvicanthis soudanais). En effet, le fait que l'activité locomotrice de cette espèce soit concentrée autour des transitions lumière/obscurité et obscurité/lumière et donc bimodale, posait la question de savoir si la physiologie de cet animal possède des caractéristiques également bimodales ou alors diurnes. Nous avons donc analysé la rythmicité journalière de plusieurs paramètres physiologiques (activité locomotrice, température, hormones et neurotransmetteurs) chez cette espèce, en la comparant avec un rongeur nocturne, le rat (*Rattus norvegicus*).

L'établissement de la diurnalité de l'Arvicanthis soudanais nous a permis d'aborder la **seconde partie de cette thèse**. La question posée était de savoir si le système sérotonergique module l'horloge circadienne principale de la même manière que chez les espèces nocturnes ou avec d'autres effets, propres aux espèces diurnes. Par le biais d'un agoniste des récepteurs 5-HT et d'un inhibiteur de recapture de la sérotonine, nous avons analysé, aux niveaux comportemental et moléculaire, l'effet de ces composés non-photiques sur les SCN, ainsi que leur modulation des effets synchroniseurs de la lumière sur l'horloge.

Enfin dans une **dernière partie**, nous avons tenté d'élucider le paradoxe sérotonergique chez le système circadien du Rat. En effet, *in vivo*, la modulation sérotonergique des SCN chez le Rat présente des propriétés similaires à celles du facteur photique alors que cette modulation est de type non-photique chez les autres rongeurs nocturnes (Hamster et Souris). Par contre, *in vitro*, la 5-HT agit de manière non-photique chez le Rat. Pour tenter d'unifier la théorie qui place le système sérotonergique comme un facteur non-photique chez tous les rongeurs nocturnes, nous avons analysé, aux niveaux comportemental et moléculaire, les effets d'un inhibiteur de recapture de la sérotonine sur l'horloge et sur sa synchronisation photique. Nous avons également tenté, à l'aide d'agonistes 5-HT spécifiques, d'identifier les récepteurs impliqués dans les différentes réponses obtenues chez le Rat.

CHAPITRE 3 - RÉSULTATS

Article 1: From daily behavioral to hormonal and neurotransmitters rhythms: comparison between diurnal and nocturnal Rat species.

Pour définir si une espèce de rongeur est diurne ou nocturne, on étudie habituellement son activité locomotrice. Si celle-ci a lieu pendant le jour ou la nuit, l'animal sera respectivement diurne ou nocturne. Alors que cette approche permet aisément de caractériser les rongeurs nocturnes, la situation est plus complexe chez les rongeurs diurnes. En effet, bien que leur activité locomotrice présente une composante diurne, cette dernière n'est pas forcément limitée à la phase de lumière du cycle LD. En fonction des individus, elle peut présenter deux pics qui se situent autour des transitions obscurité/lumière et lumière/obscurité et qui débordent plus ou moins sur la phase nocturne du cycle LD. Ces animaux ont donc une activité bimodale, plus ou moins crépusculaire. Cette particularité induit une multitude de profils d'activité locomotrice différents chez les rongeurs diurnes, comme la Gerbille mongole, le Degu du Chili, le Rat du Nil et l'Arvicanthis soudanais. De plus, chez la plupart de ces espèces, l'accès à une roue modifie leur niche temporelle. En d'autres termes, l'accès à une roue induit des modifications qui font devenir nocturne un animal qui est normalement diurne. Dès lors, on peut se demander si l'activité locomotrice est un paramètre suffisant pour définir la diurnalité ou la nocturnité d'une espèce. Les animaux, dits diurnes, mais ayant une activité bimodale, ont-ils réellement une physiologie diurne (opposée à celle des animaux nocturnes) ou est-ce que celle-ci présente des caractéristiques bimodales ?

Dans l'article qui va suivre, nous avons tenté de répondre à cette interrogation pour l'une de ces espèces diurnes, l'Arvicanthis soudanais. Nous avons comparé la rythmicité journalière de plusieurs paramètres physiologiques, comportementaux, hormonaux et cérébraux, chez cette espèce et chez un animal nocturne, *Rattus norvegicus* (Rat de souche Long-Evans). Nous avons également déterminé, chez ces deux rongeurs, les effets induits par différentes conditions lumineuses, ainsi que par l'accès à une roue sur l'activité locomotrice, la température et la prise alimentaire.

Les rythmes journaliers d'activité générale, d'activité de roue et de température sont diurnes et bimodaux chez l'Arvicanthis soudanais, alors qu'ils sont nocturnes et unimodaux chez le Rat Long-Evans. De plus, l'Arvicanthis soudanais est plus actif en LD qu'en DD, alors que c'est l'inverse chez le Rat Long-Evans. Contrairement aux autres rongeurs diurnes, l'accès à une roue ne modifie pas la niche temporelle qu'occupe l'Arvicanthis soudanais.

Le rythme journalier de leptine plasmatique est unimodal et en opposition de phase (± 12 h) entre l'Arvicanthis soudanais et le Rat Long-Evans. Dans l'hippocampe, le rythme journalier du contenu en sérotonine est également unimodal et son pic a lieu 7 h plus tôt chez l'Arvicanthis soudanais que chez le Rat Long-Evans. Le rythme de dopamine est aussi unimodal chez ces deux espèces, mais de manière inattendue, les valeurs maximales surviennent au même moment.

Cette étude multiparamétrique démontre que l'Arvicanthis soudanais, bien que partiellement bimodal, présente nombre de rythmes journaliers unimodaux le plus souvent opposés à ceux du Rat, ce qui met clairement en évidence la physiologie diurne de cette espèce.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

From daily behavior to hormonal and neurotransmitters rhythms: Comparison between diurnal and nocturnal rat species

Marc CUESTA, Daniel CLESSE, Paul PEVET and Etienne CHALLET

Hormones and Behavior, 2009, vol. 55, n° 2, pages 338-347

Pages 80-89 et pages 200-204 :

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/j.yhbeh.2008.10.015>

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/>

Article 2: Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent

La modulation sérotonergique des SCN est un phénomène qui a été très étudié chez les rongeurs nocturnes. Les agonistes sérotonergiques (8-OH-DPAT), ainsi qu'un inhibiteur de recapture de la sérotonine (fluoxétine), agissent principalement de deux manières chez le Hamster syrien et la Souris, en fonction du temps circadien où ils sont administrés.

D'une part, le 8-OH-DPAT et son énantiomère positif, injectés en milieu de jour subjectif, produisent des avances de phase de l'activité locomotrice, corrélées à une diminution transitoire de l'expression de *Per1* et *Per2* dans les SCN.

D'autre part, le 8-OH-DPAT et la fluoxétine, injectés pendant la nuit subjective, réduisent les déphasages de l'activité locomotrice induits par un créneau lumineux.

Le système sérotonergique est donc un acteur non-photique important pour la synchronisation de l'horloge circadienne principale. De plus, son rôle dans le cycle veille/sommeil est bien établi et ce cycle est bien sûr opposé entre espèces diurnes et nocturnes. Une question vient alors à l'esprit : comment le système sérotonergique module-t'il l'horloge suprachiasmatique chez les espèces diurnes ?

Pour répondre à cette interrogation, nous avons étudié l'influence d'injections de (+)8-OH-DPAT et de fluoxétine sur le fonctionnement des SCN de l'Arvicanthis soudanais, un rongeur diurne. Nous avons tout d'abord établi le contenu en 5-HT dans la région suprachiasmatique. Ce neurotransmetteur présente des variations journalières avec des valeurs maximales ayant lieu pendant le jour, qui sont en opposition de phase avec celles obtenues chez les espèces nocturnes. De plus, la courbe de réponse de phase au (+)8-OH-DPAT présente également des différences entre l'Arvicanthis soudanais et les autres espèces nocturnes. En effet, la sensibilité de l'horloge pour ce facteur non-photique a lieu essentiellement pendant la nuit subjective chez ce rongeur diurne et le jour subjectif chez les rongeurs nocturnes. Au niveau moléculaire, chez l'Arvicanthis soudanais, le (+)8-OH-DPAT et la fluoxétine n'induisent pas d'inhibition de *Per1* et de *Per2* dans les SCN, comme c'est le cas chez le Hamster syrien et la Souris.

La modulation sérotonergique des déphasages de l'activité locomotrice, induits par la lumière, est inhibitrice chez les rongeurs nocturnes. Par contre, chez l'Arvicanthis soudanais, une activation sérotonergique potentialise les réponses à la lumière au niveau comportemental et également au niveau moléculaire *via* une altération de l'expression de certains gènes horloges dans les SCN : *Per1* et *Rorβ* à la transition obscurité/lumière subjective, et *Per2* et *Rev-erba* à la transition lumière/obscurité subjective.

Cette étude démontre donc que le système sérotonergique a des effets très différents sur l'horloge suprachiasmatique entre espèces diurnes et nocturnes. De plus, la fluoxétine qui agit au niveau des SCN est fréquemment utilisée dans le traitement de la dépression chez l'Homme, une autre espèce diurne. Ces résultats différentiels mettent donc en avant l'importance, pour les applications biomédicales, de développer des modèles diurnes, dont l'organisation temporelle est plus proche de celle de l'Homme.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent

Marc CUESTA, Jorge MENDOZA, Daniel CLESSE, Paul PEVET and Etienne CHALLET

Experimental Neurology, 2008, vol. 210, n° 2, pages 501-513

Pages 92-104 :

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/j.expneurol.2007.11.026>

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/>

Article 3: New light on the serotonergic paradox in the Rat circadian system

La modulation sérotonergique de l'horloge circadienne du Rat diffère de ce que l'on trouve chez le Hamster syrien et la Souris, ce qui soulève donc un paradoxe chez les rongeurs nocturnes. En effet, alors que cette modulation est de type non-photique chez ces deux espèces (déphasages pendant le jour subjectif et inhibition des déphasages induits par la lumière pendant la nuit subjective), elle est de type photique chez le Rat (déphasages pendant la nuit subjective). De manière encore plus surprenante, en milieu de jour subjectif, l'application *in vitro* de 5-HT, d'agonistes 5-HT et de fluoxétine provoquent des effets non-photiques sur les SCN du Rat. On peut donc parler d'un double paradoxe, d'une part, entre conditions *in vitro/in vivo* chez le Rat et d'autre part, entre les espèces nocturnes *in vivo* (Hamster et Souris vs. Rat).

Dans l'article qui va suivre, en étudiant les effets de la fluoxétine sur l'horloge circadienne principale, nous avons tenté de mieux comprendre ce paradoxe sérotonergique chez le Rat, qui pourrait prendre son origine dans la grande diversité de sous-types de récepteurs 5-HT présents dans les SCN. La fluoxétine, en bloquant le transporteur de recapture de la sérotonine, permet d'augmenter la concentration de cette dernière au sein de la fente synaptique. Alors que les agonistes habituellement utilisés sont spécifiques d'un seul (ou de plusieurs) sous type(s) de récepteur(s), la sérotonine se fixera elle, sur tous les récepteurs présents.

Chez le Rat, les injections de fluoxétine, réalisées en milieu de jour subjectif, induisent des avances de phase de l'activité locomotrice, inhibent l'expression de *Per1* et de *Rorβ* et activent celle de *Rev-erba* dans les SCN. De plus, la fluoxétine réduit les avances de phase induites par la lumière en fin de nuit subjective et provoque une altération de l'expression de *Per1*, *Per2* et *Rorβ* dans les SCN. Ces résultats sont globalement similaires à ceux trouvés chez le Hamster syrien et la Souris et indiquent donc que le système sérotonergique influence l'horloge circadienne principale de manière non-photique chez le Rat.

Nous avons également cherché à savoir, chez le Rat, quels sont les récepteurs sérotonergiques responsables des effets non-photiques et des effets mimant la synchronisation photique. L'activation des récepteurs 5-HT_{1A} (avec une possible co-activation des récepteurs 5-HT₇) inhibe les avances de phase de l'activité locomotrice, induites par la lumière. Ces deux récepteurs semblent donc être responsables des effets non-photiques. L'activation des

récepteurs 5-HT₃ et 5-HT_{2C} provoque des avances de phase en fin de nuit subjective et est donc responsable des effets de mimétisme photique. Les récepteurs 5-HT_{2C} sont même capables de potentialiser les effets de la lumière en fin de nuit subjective.

Il apparaît donc que le paradoxe sérotonergique du système circadien du Rat est dû à la grande diversité des récepteurs 5-HT, présents dans les SCN. Néanmoins, chez cette espèce, comme chez les autres rongeurs nocturnes, le système sérotonergique module l'horloge circadienne principale essentiellement de manière non-photique.

New light on the serotonergic paradox in the rat circadian system

Marc Cuesta, Daniel Clesse, Paul Pévet and Etienne Challet*

Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, France

Running title: Serotonergic phase-shifts in rats

Correspondence should be addressed to:

Etienne Challet, Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal
F-67084 Strasbourg cedex, France

Phone: 33.3.88.45.66.93

Fax: 33.3.88.45.66.54

challet@neurochem.u-strasbg.fr

5-HIAA, 5-hydroxyindol acetic acid 5-HT, 5-hydroxytryptamine or serotonin CT, circadian time DD, constant darkness LD, light/dark cycle PBS, phosphate buffer saline, RT, room temperature, SCN, suprachiasmatic nuclei SSC, sodium citrate saline ZT, zeitgeber time

Abstract

The main mammalian circadian clock, localized in the suprachiasmatic nuclei can be synchronized not only with light, but also with serotonergic activation. Serotonergic agonists and serotonin reuptake inhibitors (e.g., fluoxetine) have a non-photoc influence (shifting effects during daytime and attenuation of photic resetting during nighttime) on hamsters' and mice' main clock. Surprisingly, in rats serotonergic modulation of the clock shows essentially photic-like features *in vivo* (shifting effects during nighttime). To delineate this apparent paradox, we analyzed effects of fluoxetine and serotonin agonists on rats' clock. First, fluoxetine induced behavioral phase-advances associated with down-regulated expression of the clock genes *Per1* and *Rorb* and up-regulated expression of *Rev-erba* during daytime. Moreover, fluoxetine produced an attenuation of light-induced phase-advances in association with altered expression of *Per1*, *Per2* and *Rorb* during nighttime. Second, we showed that 5-HT_{1A} receptors -maybe with coactivation of 5-HT₇ receptors- were implicated in non-photoc effects on the main clock. By contrast, 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors were involved in photic-like effects and, for 5-HT_{2C} subtype only, in potentiation of photic resetting. Thus this study demonstrates that as for other nocturnal rodents, a global activation of the serotonergic system induces non-photoc effects in the rats' clock during daytime and nighttime.

Keywords: Photic, non-photoc, serotonin, photic-like, circadian, suprachiasmatic

Introduction

In mammals, the main circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus can be synchronized by many cues, among which light is the most powerful (Klein et al. 1991). While light exposure during the (subjective) day has little or no phase-shifting effect, when applied during the (subjective) night light leads to behavioral phase-shifts that correlate with induction of the clock genes *Per1* and *Per2* within the SCN (Albrecht et al., 1997; Shigeyoshi et al., 1997; Yan et al., 1999).

Different non-photic factors also affect the SCN (Mrosovsky, 1996; Challet and Pevet, 2003). They are identified by their phase-shifting effects during the subjective day associated with a decrease in *Per1* and *Per2* expression. Activation of the serotonergic pathway from the raphe nuclei, which releases serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), acts as a non-photic synchronizer of the SCN (Meyer-Bernstein and Morin, 1996). In hamsters and mice, systemic or local injections into the SCN of 5-HT_{1A/7} receptors agonists, such as 8-OH-DPAT, induce behavioral phase-advances and decrease *Per1* and *Per2* expression only when applied at subjective midday (Tominaga et al., 1992; Cutrera et al., 1996; Horikawa et al., 2000; Ehlen et al., 2001; Horikawa and Shibata, 2004; Caldelas et al., 2005; Mendoza et al., 2008). During nighttime, the serotonergic system is well-known to modulate synchronizing effects of light. In hamsters and mice, injections of 8-OH-DPAT and serotonin reuptake inhibitors (e.g., fluoxetine) prior to a light pulse decrease light-induced phase-shifts, but they have no effect by themselves (Rea et al., 1994; Weber et al., 1998; Challet et al., 2001; Gannon and Millan, 2007). *In vitro* applications of 8-OH-DPAT and fluoxetine during the subjective day produce phase advances of firing rate in SCN neurons of mice (Prosser, 2003; Prosser et al., 2006).

In rats, only one study showed that 5-HT agonists injected *in vivo* induce behavioral phase-advances during the subjective day (i.e., non-photic effects) as for hamsters and mice (Edgar et al., 1993). By contrast, a lot of studies show that *in vitro* applications of 5-HT, 5-HT agonists or fluoxetine around projected midday act as non-photic factors, inducing phase-advances of SCN neurons' firing rate (Prosser et al., 1990; Medanic and Gillette, 1992; Shibata et al., 1992; Prosser et al., 1993; Sprouse et al., 2004b; Sprouse et al., 2006). The paucity of *in vivo* results concerning non-photic effects of the serotonergic system in rats may be due to a specificity which has never been reported in hamsters and mice. Activation of 5-HT_{1A/7} system in rats using non-specific 5-HT agonists and specific 5-HT_{2C} or 5-HT₃ receptors agonists is ineffective during the subjective day and leads to behavioral phase-shifts during the subjective night, thus mimicking photic resetting (Kennaway and Moyer, 1998;

Kohler et al., 1999; Graff et al., 2005; 2007). Moreover, these agonists injected at night induce c-FOS, *Per1* and *Per2* expression in the SCN, as light exposure does (Varcoe et al., 2003; Graff et al., 2007). It appears that in rats, the serotonergic modulation of the SCN seems paradoxical, since non-photic and photic-like characteristics are respectively found *in vitro* and *in vivo*. Moreover, in rats, the lack of *in vivo* data concerning non-photic effects on the SCN precludes from resolving this issue. It is therefore essential to obtain new *in vivo* data to delineate this paradox.

Thus, we investigated in rats the effects of fluoxetine which increases endogenous 5-HT content in the SCN synaptic cleft, therefore affecting all available receptors contrary to specific agonists of 5-HT subtype receptors. We first determined the daily content of serotonin in the SCN region. Second, we tested the behavioral and molecular effects in the SCN of i.p. injections of fluoxetine at subjective midday and late night. Third, we examined at night the ability of agonists of 5HT_{1A/7}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ and 5-HT₇ receptors to modulate light-induced phase-shifts at behavioral level.

Material and methods

Animals and housing conditions

Adult, 2- to 3-months old, male Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). All experiments were performed in accordance with the *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH published 86-23, revised 1985) and the French laws (License n°67-88 to E.C.).

Animals were housed individually in Plexiglas cages equipped with running wheels (35 x 22 x 40 cm). The wheel-running activity was continuously recorded and the data were stored in 5 min bins by VitalView (Mini-mitter Inc., Sunriver, OR, USA). Before experiments began, animals were maintained at 23°C under a 12 h light/12 h dark cycle (LD) for 2 weeks. Then, for each experiment, the animals were housed for 4 weeks in constant dim red light conditions (DD). Between each experiment, the animals were re-entrained to LD conditions as above for 2 weeks to resynchronize their circadian system to a period of 24 h. Food and water were available *ad libitum*.

Drugs

R(+)-8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin ((+)-8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A/7} receptors agonist) and fluoxetine (a 5-HT reuptake inhibitor) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 8,9-Dichloro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-pyrazino[1,2-a]quin oxalin-5(6H)-one (WAY-161503, a 5-HT_{2C} receptors agonist), 1-(*m*-Chlorophenyl)-biguanide (*m*-CPBG, a 5-HT₃ receptors agonist) and (2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin (AS-19, a 5-HT₇ receptors agonist) were purchased from Tocris Cookson (Bristol, United Kingdom). According to the manufacturers, drug solutions were freshly prepared and dissolved in 0.9% NaCl (saline) for Fluoxetine, (+)-8-OH-DPAT and *m*-CPBG, in water for WAY-161503, and in 0.9% NaCl (95%) and 100% EtOH (5%) for AS-19.

For the dose-response curve, fluoxetine concentrations of 5, 10 and 20 mg/kg were tested. For each compound, we have used concentrations known to be efficient in previous studies. The effects of 10 mg/kg fluoxetine (e.g., Challet et al., 2001; Cuesta et al., 2008), 5 mg/kg (+)-8-OH-DPAT (e.g., Cuesta et al., 2008), 3 mg/kg WAY-161503 (e.g., Cryan and Lucki, 2000), 5 mg/kg *m*-CPBG (e.g., Graff et al., 2007) and 5 mg/kg AS-19 (e.g., Perez-Garcia and Meneses, 2006; Meneses et al., 2008) were studied on behavior and its modulation on light resetting (see below).

Daily content of serotonin in the suprachiasmatic region

For this experiment, rats maintained in LD12:12 were euthanized with CO₂ and decapitated at six different *Zeitgeber* times (ZT): ZT0 (i.e., light onset), 4, 8, 12, 16 and 20 with n=5 per ZT (except for ZT4, n=4). The brains were rapidly removed. SCN region of rats brains was punched out from 600 µm brain slices, made by cryostat and stored at -80°C. After storage, samples were kept at 4°C during all the HPLC steps. SCN tissue for each brain was homogenized by ultrasonication in 100 µl solution of 0.4 M HClO₄, 0.4 mM sodium metabisulfite and 1 mM EDTA. The samples were centrifuged (13,000 rpm for 20 min) and supernatants were analyzed for 5-HT and 5-HIAA (5-hydroxyindol acetic acid) with a HPLC system using an amperometric electrochemical detector (HPLC-ED; Decade Antec, Leyden, Netherlands). The electrochemical flowcell VT-03 was an Ag/AgCl (filled with saturated KCl) versus glassy carbon electrode configuration equipped with a 50 µm spacer. For the detection, the working potential was set at 0.6 V between working electrode and auxiliary electrode. The range of sensitivity was 5 nA (full scale on the chromatogram) with an offset of 50% to avoid peak saturation, and the electrochemical signal was smoothed with a filter set

at 5 sec. The temperature for the oven, which included cell detection and the column, was maintained at 30°C. The HPLC-ED system was also composed of a high pressure pump (LC-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) and an autosampler (Triathlon, Spark, Emmen, Netherlands), which allowed sample cooling at 4°C. Each 20 µL sample (diluted in mobile phase if necessary) was injected on a 750 mm length, 4.6 mm internal diameter C18 column (Ultrasphere ODS 3µ 80A, Beckman, Fullerton, CA, USA) equipped with a guard column. The optimized mobile phase consisted of 4% methanol (V/V), 100 mM citric acid, 40 mM Na₂HPO₄ and 1 mM EDTA, dissolved in ultra pure water, 0.22 µm filtered and degassed under vacuum plus ultrasonication.

For the isocratic separation, the flow rate was kept at 0.8 mL/min and every analysis lasted 15 min. Standard solutions (prepared in 10 mM HCl) of 5-HT and 5-HIAA (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were stored at 4°C and protected from light. Appropriate dilutions in the same solution as the samples were made to obtain a 3-points standard curve with a good correlation rate for each standard. The retention times for our chromatographic conditions were 4.5 and 13.7 min for 5-HT and 5-HIAA, respectively. Values were expressed using the acquisition software Azur v4.5 (Datalys, St Martin d'Hères, France). Results were given as nmoles/g of total protein after protein assay with the Lowry method.

Behavioral experiments

We first determined the behavioral dose-response curve to fluoxetine injections. The onset of the active period in free-running nocturnal animals is defined as circadian time (CT) 12. I.p. injections of different concentrations of fluoxetine (0, 5, 10 and 20 mg/kg) were performed at CT6 with 10 animals per group. The time of injection was determined for each animal by fitting a line throughout the activity onset (CT12) over at least 9 consecutive days and projected to the day of injection.

The magnitude and direction of the elicited phase-shifts were estimated by linear regression (Clocklab Software, Actimetrics, Evanston, IL, USA) encompassing 9 days before the injection until 9 days after the injection, excluding the transitory cycles recorded for 1 or 2 cycles after the injection day. The phase-shifts were calculated as the interval between the two fitted lines and were performed by a researcher blind to the treatment. After resynchronization to LD for 14 days and transfer to DD, animals were injected again, with saline or 10 mg/kg fluoxetine (optimal dose provided by the dose-response curve) and decapitated after CO₂ euthanasia 1 h or 2 h after the injection (i.e., CT7 or CT8). Brains were removed, frozen with isopentane and stored at -80°C until *in situ* hybridization could be performed.

In a second experiment, we tested the serotonergic modulation of light-induced phase-shifts at the end of the subjective night (CT22), a time chosen in previous works for studying photic-like effects of 5-HT agonists in rats (Kohler et al., 1999; Graff et al., 2005; 2007). First, we tested the effects of saline, fluoxetine (10 mg/kg), (+)8-OH-DPAT (5 mg/kg), AS-19 (5 mg/kg), m-CPBG (5 mg/kg) and WAY-161503 in DD with and without light pulse at CT22 (n=6 per treatment). After the injection (CT21.5), each animal was transferred to an individual cage without wheel. Half an hour later (CT22), the cages were placed inside a chamber with dim red light or white light (300 lux) for 10 min. The animals were thereafter returned to the recording room with a wheel access. We quantified induced phase-shifts as explained above.

In a third experiment, animals were injected with saline or 10 mg/kg fluoxetine with or without light pulse as explained above and killed by decapitation after CO₂ euthanasia 1.5 h or 2.5 h after the injection (i.e., CT23 or CT24). Brains were removed, frozen with isopentane and stored at -80°C until *in situ* hybridization could be performed.

For both experiments, we analyzed gene expression 1 h and 2 h after onset of light pulse because in previous studies, significant effects of serotonergic agonists on gene expression were only detected 2 h after light pulses (Horikawa et al., 2000).

Radioactive in situ hybridization

Twenty µm brain coronal sections at the SCN level were made on a cryostat, mounted in series on gelatin-coated slides that were stored at -20°C. We analyzed expression of the following genes: *Per1* and *Per2*, which participate in the principal feedback loop in the SCN and *Rev-erba* (*NR1D1*) and *Rorβ* (*NR1F2*), which are involved in secondary feedback loops (Dardente and Cermakian, 2007) and implicated in the clock resetting (Masana et al., 2007; Meng et al., 2008). The *rPer1* and *rPer2* clones were a gift from Prof. H. Okamura (Department of Anatomy and Brain Science, Kobe University School of Medicine, Japan). The other probes were synthesized from the following nucleotide sequences available on GenBank: *rRev-erba* (NM_145775 nucleotides 908-1890) and *mRorβ* (NM_146095 nucleotides 980-1742). The sense (to check specificity of the signal) and antisense probes were transcribed in the presence of α³⁵S-UTP (1250 Ci/mmol, PerkinElmer, Milano, Italy) according to the manufacturer's protocol (MAXIscript, Ambion, Austin, TX, USA).

Briefly, sections were postfixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 15 min, rinsed two times in 1X PBS (phosphate buffer saline) for 5 min each, and then acetylated twice for 5 min in 0.1 M triethanolamine, 0.375% acetic anhydride. After a 1X PBS rinse for

5 min, sections were dehydrated in graded ethanol series and finally dried at room temperature (RT). Hybridization was carried out at 54°C overnight with radiolabeled probe (1.10^7 c.p.m. per ml of hybridization medium buffer) in a solution containing 50% deionized formamide, 10% sulfate dextran, 1X denhardt's solution, 2X SSC (sodium citrate saline), 0.5 mg/ml salmon sperm DNA, 0.25 mg/ml transfer RNA, 10 mM dithiothreitol. After hybridization, the sections were washed twice for 10 min in 4X SSC before being treated with ribonuclease A (Sigma-Aldrich; 2 µg/µl) for 30 min at 37°C. The slides were then rinsed and stringency washes were carried out (2X SSC for 10 min at RT, 1X SSC for 10 min at RT, 0.5X SSC for 10 min at RT and 0.2X SSC for 30 min at 62°C). Finally, the sections were dehydrated in a graded ethanol series and air-dried at RT. Slides were exposed with ^{14}C standards to an autoradiographic film (BioMax, Kodak, Lyon, France) for 4-6 days. Analysis of the autoradiograms was performed using NIH-ImageJ software. Standards and background were subtracted. For each probe and each animal, quantification was performed bilaterally on three sections of middle SCN.

Statistical analysis

Data are presented as mean±SEM. All the data were analyzed with one-, two-way or three-way analyses of variance (ANOVA; SigmaStat software, Jandel Scientific, Chicago, IL, USA). Student-Newman-Keuls post-hoc tests were used if main effects or interactions were found to be significant.

For the daily content of serotonin, data were also fitted by a non-linear regression using cosinor analysis (SigmaPlot software, Jandel Scientific, Chicago, IL, USA). This analysis was performed using the following equation $y = A + (B * \cos(2\pi(x-C)/24))$, where A is the mean level, B the amplitude and C the acrophase of the rhythm.

Results

Daily variation of 5-HT and 5-HIAA content in the SCN region

The levels of 5-HT and its metabolite 5-HIAA were assessed throughout 24 h in the SCN region of Long-Evans rats. A one-way ANOVA showed a significant effect of time for 5-HT ($p < 0.05$; Fig. 1A) and 5-HIAA concentrations ($p < 0.05$; Fig. 1A). Post-hoc analyses revealed that 5-HT levels are significantly lower at ZT0 compared to ZT12 and ZT16 ($p < 0.05$). For 5-HIAA level, we found differences for both ZT0 and ZT4 compared to ZT12 and

ZT16 ($p < 0.05$). Furthermore the cosinor analysis detected rhythmicity for both 5-HT and 5-HIAA (Fig. 1A and 1B) with acrophases at ZT13 and ZT15, respectively ($p < 0.01$ for the two non-linear regressions).

Dose-response curve and molecular changes in response to fluoxetine treatment at CT6

To characterize whether the serotonergic system could modulate the circadian clock with non-photoc properties, rats were injected i.p. with fluoxetine at CT6. These injections produced behavioral phase-advances in a dose-dependent manner ($p < 0.001$; Fig. 2A and 2B). Fluoxetine (5 mg/kg) induced phase-advances (17 ± 2 min) which were significantly smaller than those after 10 and 20 mg/kg fluoxetine injections (30 ± 4 and 36 ± 3 min, respectively).

To understand the molecular mechanisms implicated in the behavioral phase-advances induced by fluoxetine at CT6, we analyzed mRNA levels of clock genes, namely *Per1*, *Per2*, *Rev-erb α* and *Ror β* , in the SCN 1 h and 2 h after injection of saline or fluoxetine. For *Per1* expression, we found an effect of drug treatment ($p < 0.001$; Fig. 3A; Table 1). At CT6+1h, fluoxetine injections decreased *Per1* mRNA level (2-fold less) compared to saline injections ($p < 0.05$). At CT6+2h, fluoxetine treatment had no effect on *Per1* expression ($p = 0.07$). *Per2* expression was not significantly affected by time ($p = 0.6$), nor by fluoxetine injections ($p = 0.3$; Fig. 3B; Table 1). *Rev-erba* expression was significantly altered by time ($p < 0.05$) and there was also a significant interaction between drug treatment and time ($p < 0.05$; Fig. 3C; Table 1). At CT6+1h, fluoxetine injections induced an increased expression of *Rev-erba* ($p < 0.05$) which is transient since fluoxetine had no longer an effect at CT6+2h ($p = 0.5$). *Ror β* expression was modified both by drug treatment ($p < 0.05$) and time ($p < 0.001$; Fig. 3D; Table 1). At CT6+1h, fluoxetine injections did not modify *Ror β* mRNA level ($p = 0.4$), whereas they decreased *Ror β* expression at CT6+2h (1.5-fold less) as compared to saline injections ($p < 0.05$; Table 1).

Behavioral responses of the main circadian clock to fluoxetine and serotonergic agonists with or without light pulses at CT22

To analyze the effects of a serotonergic stimulation on light-induced phase-shifts, we injected saline, fluoxetine, (+)8-OH-DPAT, AS-19, m-CPBG or WAY-161503, followed or not by a light pulse at CT22. A two-way ANOVA detected significant effects of drug treatment ($p < 0.001$) and light pulse ($p < 0.001$) and a significant [drug treatment x light] interaction ($p < 0.05$; Figs. 4 and 5). Without light pulse, fluoxetine, (+)8-OH-DPAT and AS-19 injections did

not produce larger behavioral phase-advances compared to saline injections ($p = 0.9, 0.7$ and 0.7 , respectively). The 5-HT₃ (m-CPBG) and 5-HT_{2C} (WAY-161503) agonists, however, induced significant phase-advances of 36 ± 2 min ($p < 0.05$) and 84 ± 6 min ($p < 0.001$), respectively. All injections coupled with light pulses induced phase-advances significantly different from those after injections without light pulses ($p < 0.05$ for all treatments). Nevertheless, there were differences in the magnitude of the phase-advances depending on the drug treatment. Fluoxetine and (+)8-OH-DPAT injected prior to light pulse decreased the phase-advances normally induced by Veh/light treatment (42 ± 3 min and 45 ± 4 min, respectively, vs. 73 ± 6 min; $p < 0.01$ for both comparisons). Moreover, 5-HT_{2C} agonist/light treatment led to phase-advances larger than those obtained after Veh/light treatment (111 ± 14 min vs. 73 ± 6 min; $p < 0.001$). 5-HT₇ agonist/light and 5-HT₃ agonist/light treatments, however, did not modify phase-advances induced by Veh/light treatment ($p = 0.6$ for both comparisons).

Molecular responses of the main circadian clock to fluoxetine and serotonergic agonists with or without light pulses at CT22

Concerning the molecular changes induced by the different treatments, a three-way ANOVA detected a significant effect of light pulse ($p < 0.001$) and a significant [drug treatment x light pulse] interaction between ($p < 0.05$) for *Per1* expression (Fig. 6A). At CT22+2h, *Per1* mRNA level induced by Veh/light treatment was significantly lower than that at CT22+1h ($p < 0.01$). This decreased expression was significantly inhibited by Fluox/Light treatment ($p < 0.05$) in accordance with inhibition of light-induced phase-shifts (Table 1).

For *Per2* expression (Fig. 6B), we found significant effects of time ($p < 0.05$) and light pulse ($p < 0.001$), and a significant interaction between drug treatment and light pulse ($p < 0.05$). At CT22+1h, Fluox/light treatment induced an increase of *Per2* mRNA levels ($p < 0.05$) compared to Veh/light treatment. Unexpectedly, this *Per2* increase was associated with inhibition of light-induced phase-shifts (Table1). At CT22+2h, *Per2* expression did not differ after Fluox/dark and Veh/dark treatments ($p = 0.9$), whereas Veh/light and Fluox/light treatments produced a similar increase of *Per2* mRNA levels ($p < 0.05$ for both treatments).

A three way-ANOVA indicated that *Rev-erba* expression was not significantly affected by drug treatment ($p = 0.6$), time ($p = 0.6$) or light ($p = 0.5$; Table1).

For *Rorβ* expression (Fig. 6C), significant effects were obtained for drug treatment ($p < 0.01$) and light pulse ($p < 0.05$). There were also significant interactions between drug treatment and

time ($p < 0.001$) and between time and light pulse ($p < 0.001$). At CT22+1h, Fluox/dark or Fluox/light treatments produced an increase of *Rorb* expression compared to Veh/dark ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) or Veh/light treatments ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). At CT22+2h, *Rorb* mRNA levels were significantly increased by both Veh/light and Fluox/light treatments compared to Veh/dark ($p < 0.05$ for both) and Fluox/dark treatments ($p < 0.05$ for both), suggesting an implication of this gene in light-induced phase-shifts (Table1).

Discussion

This study in rats shows the ability of the serotonergic system to modulate the SCN clock *via* non-photoc, behavioral responses similar to what was reported for mice and hamsters, including resetting during daytime and down-regulation of photic resetting at night. Indeed, the 5-HT reuptake inhibitor fluoxetine induces dose-dependent behavioral phase-advances in association with decreased *Per1* and *Rorb* expression and increased *Rev-erba* expression in the SCN during the subjective midday. At the end of the subjective night, fluoxetine inhibits light-induced phase-advances in correlation with alterations of *Per1*, *Per2* and *Rorb* expression. Moreover, 5-HT_{1A} receptors -maybe with coactivation of 5-HT₇ receptors- are likely to mediate the non-photoc effects of 5-HT on the SCN during nighttime. The photic-like effects specifically observed in rats involve both 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors activation, the latter being able to potentiate light-induced phase-advances.

Daily rhythm of serotonin content in the SCN

The SCN clock triggers daily rhythmicity in raphe nuclei *via* rhythmic secretion of corticosterone from the adrenal glands (Malek et al., 2007). 5-HTergic neurons in anterior raphe nuclei innervate the whole forebrain, including the SCN (Meyer-Berstein and Morin, 1996). Here we show a daily rhythm of 5-HT content in the SCN with peak for 5-HT and its metabolite 5-HIAA at early night and midnight, respectively. Previous studies using a similar method in rats also found daily variations, but with later acrophases for 5-HT and 5-HIAA content (Poncet et al., 1993). In both cases maximal values occur during nighttime, in keeping with the fact that activity of serotonergic neurons is closely correlated with the arousal level (Jacobs and Fornal, 1999), the rat's period of activity occurring at night. Moreover, in accordance with our 5-HT content data, 5-HT release in the SCN, assessed by microdialysis, reaches a maximum in early night in hamsters and rats (Dudley et al., 1998; Barassin et al.,

2002). Thus, the endogenous serotonin rhythm in the SCN of rats may convey feedback signals to the SCN clock when animals start their period of activity.

During the light period, when levels of 5-HT in the SCN are low, fluoxetine injections induce a direct effect to the SCN clock whereas these injections (without light pulses) are ineffective during nighttime when levels of 5-HT are high. The variation of 5-HT content in the SCN can explain in part the ability of fluoxetine to exert direct effects on the SCN only during daytime. A recent study in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei* is in agreement with this hypothesis (Cuesta et al., 2008). In this species, variations of 5-HT content in the SCN show high and low values during daytime and nighttime, respectively whereas fluoxetine injections induce behavioral phase-advances during nighttime and are ineffective during daytime (i.e., the shifting effects of fluoxetine are opposite in circadian times to those in rats). Thus, albeit different, the temporal windows of SCN sensitivity to fluoxetine occur in both diurnal and nocturnal species when levels of 5-HT in the SCN are low.

Serotonergic system in rats acts with non-photoc features during daytime

In hamsters and mice, injections of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A/7} receptors agonist, around subjective midday induce behavioral phase-advances associated with transient decrease in *Per1* and *Per2* mRNA levels (Cutrera et al., 1996; Horikawa et al., 2000; Ehlen et al., 2001; Horikawa and Shibata, 2004; Caldelas et al., 2005; Mendoza et al., 2008). In rats, only one study performed *in vivo* shows similar results with 8-OH-DPAT, but only at the behavioral level (Edgar et al., 1993). Here we use fluoxetine, a 5-HT reuptake inhibitor, which increases the concentration of endogenous 5-HT in the synaptic clefts. Many works show that an acute injection of 10 mg/kg i.p. fluoxetine (as used in the present study) increases the extracellular levels of 5-HT in a lot of brain areas including hypothalamus (with an increase of 239±15% compared to baseline values; Malagié et al., 1995; Koch et al., 2002). By this way, the effects of fluoxetine may be closer to physiological processes than those triggered by 8-OH-DPAT since this agonist only binds to 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors, while fluoxetine acts indirectly (i.e., via endogenous 5-HT) to all 5-HT receptors present in the SCN region. *In vitro* treatment with fluoxetine at projected midday produces phase-shifts of SCN firing rate in rats and mice (Prosser et al., 2006; Sprouse et al., 2006). In hypothalamic slices, fluoxetine alone or with L-tryptophan induces non-photoc-like phase-shifts in mice and rats, respectively. Our study demonstrates that *in vivo* fluoxetine treatment also induces phase-advances in a dose-dependent manner even if the magnitude of the phase-shifts is smaller compared to those induced by 8-OH-DPAT in mice and hamsters (Cutrera et al., 1996; Horikawa and Shibata,

2004). Moreover, at subjective midday, fluoxetine down-regulates *Per1* expression as previously described for 8-OH-DPAT in hamsters (Horikawa et al., 2000) but not on *Per2*. Furthermore, *Rev-erba* and *Rorb*, which respectively repress and activate *Bmal1* transcription (Guillaumond et al., 2005), were activated and inhibited by fluoxetine injections, respectively. To our knowledge, this is the first report that expression of these clock genes is affected by 5-HTergic resetting. In rats, therefore, a global activation of the serotonergic system via fluoxetine produces non-photoc effects in the SCN during daytime as in hamsters and mice. It appears that an acute injection of 10 mg/kg fluoxetine, which increases extracellular levels of 5-HT (Koch et al., 2002; Malagié et al., 1995), induces significant behavioral phase-advances and alters clock gene expression, indicating that this dose is relevant to study its effects on the main circadian clock.

Serotonergic system in rats acts via non-photoc features during nighttime

During the subjective night, fluoxetine (10 mg/kg) and 8-OH-DPAT (2.5 mg/kg) inhibit light-induced phase-shifts of locomotor activity in hamsters and mice (Rea et al., 1994; Weber et al., 1998; Challet et al., 2001; Gannon and Millan, 2007). Surprisingly, (+)8-OH-DPAT injections (25-42 mg/kg) fail to inhibit light-induced phase-shifts in mice (Antle et al., 2003). Here, we show in rats that fluoxetine and (+)8-OH-DPAT have the same non-photoc effects on light resetting as those obtained in hamsters and mice. Furthermore, we demonstrate that neither fluoxetine nor (+)8-OH-DPAT injected alone induce photic-like behavioral phase-advances. These results strongly suggest that during nighttime, a global activation of the serotonergic system in rats produces non-photoc effects, but not photic-like responses.

The reduction of light-induced FOS expression in the SCN by 8-OH-DPAT injections is smaller in rats compared to hamsters (Glass et al., 1994; Recio et al., 1996). To our knowledge, however, serotonergic modulation of light-induced clock gene expression has not been explored yet in rodents. On the one hand, our study confirms that light pulses in late night induce a rapid, transient increase of *Per1* expression and a slow increase of *Per2* (Zylka et al., 1998; Yan and Silver, 2002). In addition, we show that light pulses also affect positively *Rorb* expression, as observed in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei* (Cuesta et al., 2008). On the other hand, fluoxetine modulates positively light-induced *Per1* expression. Moreover, fluoxetine slightly affects light-induced expression of *Per2* and *Rorb*. Unexpectedly, *Rorb* mRNA levels are increased by fluoxetine injection alone, whereas this injection does not produce significant behavioral phase-shifts. Further studies are thus needed

to delineate the exact role of *Rorb* in clock resetting. The modulation of clock genes by association of photic and non-photoc factors remains controversial. The unifying explanation for interactions between photic and non-photoc factors in which light-induced *Per* expression during nighttime is inhibited by non-photoc cues (Maywood and Mrosovsky, 2001) does not fit exactly with our results and other works. For instance, access to a novel wheel-running in hamsters alters light-induced phase-shifts without affecting *Per1* expression in the SCN (Christian and Harrington, 2002; Edelstein et al., 2003). Other molecular mechanisms, such as post-translational modifications, are probably implicated in the photic/non-photoc interactions.

Serotonergic receptors implicated in non-photoc and photoc-like effects

Several 5-HT receptor subtypes (including 5-HT_{1A}, 1B, 2A, 2C, 5A and 7) have been described in the SCN of mice, hamsters and rats (Table 2). There is a lack of evidence, however, concerning their precise localization (pre- or postsynaptic) and the cell type in which they are expressed. In hamsters and mice, 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors are also present in other structures of the circadian system, such as the raphe or the intergeniculate leaflet (Chalmer and Watson, 1991; Duncan et al., 1999; Bonaventure et al., 2002) which participate to non-photoc (serotonergic) effects (Rusak et al., 1989; Biello et al., 1994; Challet et al., 1998; Schuhler et al., 1998; Ehlen et al., 2001). Because drugs were injected systemically in the present work, we cannot exclude that the observed phase-shifts result at least partially from indirect effects of serotonergic activation at these extra-SCN levels.

Depending on the 5-HT receptor activated and timing, modulation of SCN function in rats can share either non-photoc or photoc-like features (Fig. 7). Interestingly, fluoxetine treatment in rats produces non-photoc-like effects that can be mimicked by (+)8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A/7} agonist. A new 5-HT₇ agonist (AS-19), however, fails to produce non-photoc effects (i.e., inhibition of light-induced phase-shifts). It is possible that the dose used in the present study (5mg/kg) was too low to affect the SCN clock, even if it impaired memory consolidation (Perez-Garcia and Meneses, 2006; Meneses et al., 2008). Therefore, a global activation of the serotonergic system with fluoxetine or a more specific activation of 5-HT_{1A} receptors - possibly with coactivation of the 5-HT₇ subtype- produces non-photoc effects during daytime and nighttime. This interpretation fits with potentiation of photoc resetting in hamsters treated with 5-HT_{1A} receptor antagonists (Rea et al., 1995; Kessler et al., 2008). Of note, both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ knockout mice fail to show behavioral phase-advances after 8-OH-DPAT injections during daytime (Gardani and Biello, 2008; Smith et al., 2008), reinforcing the

hypothesis that both receptor subtypes participate to behavioral shifts around midday. Further investigations with higher doses of AS19 should be performed to delineate the exact role of the 5-HT₇ receptor. Furthermore, 5-HT_{5A} receptors in the rat SCN could also be implicated in non-photoc effects during daytime (Sprouse et al., 2004a).

The 5-HT₃ receptors have been proposed to participate in photic-like resetting effects (Graff et al., 2007) because specific and non-specific 5-HT₃ receptor agonists injected systemically or locally into the rat SCN induce phase-advances during nighttime (Kalkowski and Wollnik, 1999; Kohler et al., 1999; Graff et al., 2005; 2007). Furthermore, enucleation reduces these phase-advances, therefore suggesting a presynaptic localization of 5-HT₃ receptors on retino-hypothalamic terminals (Graff et al., 2005). Activation of the 5-HT_{2C} receptor with 5-HT₂ agonists also produces photic-like effects in rats. Here we confirm that activation with specific 5-HT_{2C} and 5-HT₃ agonists (WAY-161503 and m-CPBG, respectively) at late night leads to photic-like phase-advances of locomotor activity rhythm. Moreover, activation of 5-HT_{2C} receptors can potentiate light-induced phase-advances, while activation of 5-HT₃ receptors has no additive effect. The lack of potentiating effect after 5-HT₃ receptors activation may be due to their presynaptic localization. Activation of this receptor increases intracellular calcium concentration in glutamatergic terminals, thereby inducing glutamate release (Van Hooft and Vijverberg, 2000; Funahashi et al., 2004). After a light pulse, which induces a massive release of glutamate in the SCN, the supplementary release produced by 5-HT₃ receptors activation may not be sufficient to potentiate light resetting. By contrast, 5-HT_{2C} receptors are preferentially localized post-synaptically (Moyer and Kennaway, 1999). Their activation, independently of light-induced glutamate release, can potentiate light-induced phase-shifts in rats (present study), but not in hamsters (Gannon and Millan, 2006).

The lack of modulating effect of 5-HT₃ receptors activation on light-induced phase-advances may be also due to an inadequate (i.e., too small) dose of the 5-HT₃ agonist, m-CPBG. If 5-HT₃ receptors were critical for modulating photic synchronization, it would be very unexpected that 5 mg/kg m-CPBG were able to induce photic-like effects and to increase c-FOS expression in the SCN (Graff et al. 2007) without the slightest effect on light resetting (present study). Further dose-response studies are needed to test this hypothesis.

To sum up, the serotonergic system in rats can markedly influence the SCN clock with preferentially non-photoc effects (i.e., shifting effects of the SCN clock during the subjective day and modulation of photic resetting during the subjective night) after global stimulation with fluoxetine or after activation of 5-HT_{1A} (+ 5-HT₇?) receptors. This serotonergic system, however, can also produce photic-like resetting via 5-HT_{2C} and 5-HT₃ receptors but only

during the subjective night (Moyer et al., 1997; Kohler et al., 1999; Kennaway et al., 2001). This dichotomy in serotonergic modulation is difficult to interpret because non-photic and photic-like effects are opposed. Here we show in normal conditions that the non-photic effects are predominant after global activation of the 5-HTergic system. Since all receptors are likely activated by fluoxetine-induced blockade of 5-HT reuptake, it is possible that the characteristics of the various subtypes of 5-HT receptors (e.g., density, affinity to 5-HT) are different in the SCN (for instance, with more 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors compared to 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors). In addition, the dominance of non-photic effects upon photic-like effects may rely on the final balance between different intra-cellular cascades in SCN cells following activation of various 5-HT subtype receptors. Maybe in physiopathological conditions, photic-like effects could be preferentially selected to maintain or simulate regular photic synchronization. Nevertheless, the study of the rat's paradox has provided new clues on the role of the different 5-HT receptors in the SCN, suggesting that the development of chronobiotic drugs more specific than fluoxetine could be helpful for the treatment of neurological disorders, such as depression.

Acknowledgements

We thank Dr. H. Dardente and Dr. J. Mendoza for helpful comments on the manuscript. We also thank S. Gourmelen and Dr. D. Sage-Ciocca for their expert assistance. The plasmids for synthesis of rPer1 and rPer2 were generously donated by Dr. H. Okamura (Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan). We are also indebted to Dr. H. Dardente for plasmids of rRev-erba and mRorβ. This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche 'Jeunes Chercheurs/Jeunes Chercheuses' (E.C.) and Centre National de la Recherche Scientifique (E.C. and P.P.) and a doctoral fellowship from the French Ministry of National Education and Research (M.C.).

References

- Albrecht U., Sun Z.S., Eichele G., Lee C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mPer1 and mPer2, to light. *Cell* **91**, 1055-1064.
- Antle M.C., Ogilvie M.D., Pickard G.E., Mistlberger R.E. (2003) Response of the mouse circadian system to serotonin 1A/2/7 agonists in vivo: surprisingly little. *J. Biol. Rhythms* **18**, 145-158.
- Barassin S., Raison S., Saboureau M., Bienvenu C., Maitre M., Malan A., Pevet P. (2002) Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **15**,833-840.
- Bellenky M.A., Pickard G.E. (2001) Subcellular distribution of 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* **432**, 371-388.
- Bert B., Fink H., Hörtnagl H., Veh RW., Davies B., Theuring F., Kusserow H. (2006) Mice over-expressing the 5-HT_{1A} receptor in cortex and dentate gyrus display exaggerated locomotor and hypothermic response to 8-OH-DPAT. *Behav. Brain Res.* **167**, 328-341.
- Biello S.M., Janik D., Mrosovsky N. (1994) Neuropeptide Y and behaviorally induced phase-shifts. *Neuroscience* **62**, 273-279.
- Bonaventure P., Nepomuceno D., Kwok A., Chai W., Langlois X., Hen R., Stark K., Carruthers N., Lovenberg T.W. (2002) Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [³H]5-carboxamidotryptamine and [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT_{1A} knockout and 5-HT_{1A/1B} double-knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 240-248.
- Caldelas I., Challet E., Saboureau M., Pevet P. (2005) Light and melatonin inhibit in vivo serotonergic phase advances without altering serotonergic-induced decrease of per expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Mol. Neurosci.* **25**, 53-63.
- Challet E., Pevet P. (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front. Biosci.* **8**, s246-s257.
- Challet E., Scarbrough K., Pevet P. and Turek F.W. (1998) Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J. Biol. Rhythms* **13**, 410-421.
- Challet E., Turek F.W., Laute M., Van Reeth O. (2001) Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: role of serotonergic and metabolic signals. *Brain Res.* **909**, 81-91.
- Chalmers D.T., Watson S.J. (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain—a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res.* **561**, 51-60.
- Christian C.A., Harrington M.E. (2002) Three days of novel wheel access diminishes light-induced phase delays in vivo with no effect on Per1 induction by light. *Chronobiol. Int.* **19**, 671-682.
- Cuesta M., Mendoza J., Clesse D., Pévet P., Challet E. (2008) Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. *Exp. Neurol.* **210**, 501-513.
- Cutrer R.A., Saboureau M., Pevet P. (1996) Phase-shifting effect of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor agonist, on locomotor activity in golden hamster in constant darkness. *Neurosci. Lett.* **210**, 1-4.
- Cryan J.F., Lucki I. (2000) Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**: 1120-1126.
- Dardente H., Cermakian N. (2007) Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol. Int.* **24**, 195-213.

- Dudley T.E., DiNardo L.A., Glass J.D. (1998) Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **18**, 5045-5052.
- Duncan M.J., Short J., Wheeler D.L. (1999) Comparison of the effects of aging on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res.* **829**, 39-45.
- Duncan M.J., Jennes L., Jefferson J.B., Brownfield M.S. (2000) Localization of serotonin(5A) receptors in discrete regions of the circadian timing system in the Syrian hamster. *Brain Res.* **869**, 39-45.
- Edelstein K., de la Iglesia H.O., Schwartz W.J., Mrosovsky N. (2003) Behavioral arousal blocks light-induced phase advances in locomotor rhythmicity, but not light-induced Per1 and Fos expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **118**, 253-261.
- Edgar D.M., Miller J.D., Prosser R.A., Dean R.R., Dement W.C. (1993) Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J. Biol. Rhythms* **8**, 17-31.
- Ehlen J.C., Grossman G.H., Glass J.D. (2001) In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT₇ receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **21**, 5351-5357.
- Funahashi M., Mitoh Y., Matsuo R. (2004) Activation of presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates glutamatergic synaptic inputs to area postrema neurons in rat brain slices. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **26**, 615-622.
- Gannon R.L., Millan M.J. (2006) Serotonin(1A) autoreceptor activation by S15535 enhances circadian activity rhythms in hamsters: evaluation of potential interactions with serotonin2A and serotonin2C receptors. *Neuroscience* **137**, 287-299.
- Gannon R.L., Millan M.J. (2007) Evaluation of serotonin, noradrenaline and dopamine reuptake inhibitors on light-induced phase-advances in hamster circadian activity rhythms. *Psychopharm. (Berl.)* **195**, 325-332.
- Gardani M., Biello S.M. (2008) The effects of photic and nonphotic stimuli in the 5-HT₇ receptor knockout mouse. *Neuroscience* **152**, 245-253.
- Glass J.D., Selim M., Rea M.A. (1994) Modulation of light-induced c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus by 5-HT_{1A} receptors agonists. *Brain Res.* **638**, 235-242.
- Guillaumond F., Dardente H., Giguere V., Cermakian N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* **20**, 391-403.
- Graff C., Kohler M., Pévet P., Wollnik F. (2005) Involvement of the retino-hypothalamic tract in the photic-like effects of the 5-HT agonist quipazine in the rat. *Neuroscience* **135**, 273-283.
- Graff C., Challet E., Pévet P., Wollnik F. (2007). 5-HT₃ receptor-mediated photic-like responses of the circadian clock in the rat. *Neuropharmacology* **52**, 662-671.
- Horikawa K., Yokota S., Fuji K., Akiyama M., Moriya T., Okamura H., Shibata S. (2000) Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* **20**, 5867-5873.
- Horikawa K., Shibata S. (2004) Phase-resetting response to (+)8-OH-DPAT, a serotonin(1A/7) receptor agonist, in the mouse in vivo. *Neurosci. Lett.* **368**, 130-134.
- Jacobs B.L., Fornal C.A. (1999) Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* **21**, 9S-15S.
- Kalkowski A., Wollnik F. (1999) Local effects of the serotonin agonist quipazine on the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroreport* **10**, 3241-3246.
- Klein D.C., Moore R.Y., Reppert S.M. (1991) *Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock.* Oxford University Press, New York.

- Kennaway D.J., Moyer R.W. (1998) Serotonin 5-HT_{2C} agonists mimic the effect of light pulses on circadian rhythms. *Brain Res.* **806**, 257-270.
- Kennaway D.J., Moyer R.W., Voultsios A., Varcoe T.J. (2001) Serotonin, excitatory amino acids and the photic control of melatonin rhythms and SCN c-FOS in the rat. *Brain Res.* **897**, 36-43.
- Kessler E.J., Sprouse J., Harrington, M.E. (2008) NAN-190 potentiates the circadian response to light and speeds re-entrainment to advanced light cycles. *Neuroscience* **154**, 1187-1194.
- Koch S., Perry K.W., Nelson D.L., Conway R.G., Threlkeld P.G., Bymaster F.P. (2002) R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology* **27**, 949-959.
- Kohler M., Kalkowski A., Wollnick F. (1999) Serotonin agonist quipazine induces photic-like phase-shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms.* **14**, 131-140.
- Malagié I., Trillat A.C., Jacquot C., Gardier A.M. (1995) Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* **286**, 213-217.
- Malek Z.S., Sage D., Pévet P., Raison S. (2007) Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology* **148**, 5165-5172.
- Manrique C., Francois-Bellan A.M., Segu L., Becquet D., Hery M., Faudon M., Hery F. (1994) Impairment of serotonergic transmission is followed by adaptive changes in 5-HT_{1B} binding site in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **663**, 93-100.
- Masana M.I., Sumaya I.C., Becker-Andre M., Dubocovich M.L. (2007) Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C₃H/HeN mice homozygous for the ROR β knockout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, 2357-2367.
- Maywood E.S., Mrosovsky N. (2001) A molecular explanation of interactions between photic and non-photoc circadian clock-resetting stimuli. *Brain Res. Gene. Expr. Patterns* **1**, 27-31.
- Medanic M., Gillette M.U. (1992) Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic pacemaker in vitro only during subjective day. *J. Physiol.* **450**, 629-642.
- Mendoza J., Clesse D., Pévet P., Challet E. (2008) Serotonergic potentiation of dark pulse-induced phase-shifting effects at midday in hamsters. *J. Neurochem.* **106**, 1404-1414.
- Meneses A., Perez-Garcia G., Liv-Salmeron G., Flores-Galvez D., Castillo C., Castillo E. (2008) The effects of the 5-HT₆ receptor agonist EMD and the 5-HT₇ receptor agonist AS19 on memory formation. *Behav. Brain Res.* **195**, 112-119.
- Meng Q.J., McMaster A., Beesley S. et al (2008) Ligand modulation of REV-ERB α function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner. *J. Cell. Sci.* **121**, 3629-3635.
- Meyer-Bernstein E.L., Morin L.P. (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J. Neurosci.* **16**, 2097-2111.
- Moyer R.W., Kennaway D.J. (1999) Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* **271**, 147-150.
- Moyer R.W., Kennaway D.J., Ferguson S.A., Dijkstra Y.P. (1997) Quipazine and light have similar effects on c-fos induction in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **765**, 337-342.
- Mrosovsky N. (1996) Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **71**, 343-372.

- Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M (2001) Localization of 5-HT₇ receptors in the rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J. Chem. Neuroanat.* **21**, 63-73.
- Oliver K.R., Kinsey A.M., Wainwright A., Sirinathsinghji D.J.S. (2000) Localization of 5-HT_{5A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* **867**, 131-142.
- Perez-Garcia G.S., Meneses A. (2006) Effects of the potential 5-HT₇ receptor agonist AS 19 in an autoshaping learning task. *Behav. Brain Res.* **163**, 136-140.
- Pickard G.E., Smith B.N., Belenky M, Rea M.A., Dudek F.E., Sollars P.J. (1999) 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **19**, 4034-4045.
- Pickard G.E., Weber E.T., Scott P.A., Riberdy A.F., Rea M.A. (1996) 5HT_{1B} receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **16**, 8208-8220.
- Poncet L., Denoroy L., Jouvet M. (1993) Daily variations in in vivo tryptophan hydroxylation and in the contents of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete brain areas of the rat. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* **92**, 137-150.
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251-260.
- Prosser R.A. (2003) Serotonin phase-shifts the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain res.* **966**, 110-115.
- Prosser R.A., Miller J.D., Heller H.C. (1990) A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res.* **534**, 336-339.
- Prosser R.A., Dean R.R., Edgar D.M., Heller H.C., Miller J.D. (1993) Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *J. Biol. Rhythms* **8**, 1-16.
- Prosser R.A., Lee H.M., Wehner A. (2006) Serotonergic pre-treatments block in vitro serotonergic phase-shifts of the mouse suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Neuroscience* **142**, 547-555.
- Rea M.A., Glass J.D., Colwell C.S. (1994) Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* **14**, 3635-3642.
- Rea M.A., Barrera J., Glass J.D., Gannon R.L. (1995) Serotonergic potentiation of photic phase shifts of the circadian activity rhythm. *Neuroreport* **6**, 1417-1420.
- Recio J., Pévet P., Masson-Pévet M. (1996) Serotonergic modulation of photically induced increase in melatonin receptor density and Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *J. Neuroendocrinol.* **8**, 839-845.
- Rusak B., Meijer J.H., Harrington M.E. (1989) Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. *Brain Res.* **493**, 283-291.
- Schuhler S., Saboureaux M., Pitrosky B., Pevet P. (1998) In Syrian hamsters, 5-HT fibres within the suprachiasmatic nuclei are necessary for the expression of 8-OH-DPAT induced phase-advance of locomotor activity rhythm. *Neurosci. Lett.* **256**, 33-36.
- Shibata S., Tsuneyoshi A., Hamada T., Tominaga K., Watanabe S. (1992) Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin_{1A} receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res.* **582**, 353-356.
- Shigeyoshi Y., Tagushi K., Yamamoto S. et al (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* **91**: 1043-1053.

- Smith B.N., Sollars P.J., Dudek F.E., Pickard G.E. (2001) Serotonergic modulation of retinal input to the mouse suprachiasmatic nucleus mediated by 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors. *J. Biol. Rhythms* **16**, 25-38.
- Smith V.M., Sterniczuk R., Phillips C.I., Antle M.C. (2008) Altered photic and non-photoc phase shifts in serotonin_{1A} receptor knockout mice. *Neuroscience*, **157**, 513-23
- Sprouse J., Reynolds L., Braselton J., Schmidt A. (2004a) Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT_{5A} receptors? *Synapse* **54**, 111-118.
- Sprouse J., Reynolds L., Li X., Braselton J., Schmidt A. (2004b) 8-OH-DPAT as a 5-HT₇ agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology* **46**, 52-62.
- Sprouse J., Braselton J., Reynolds L. (2006) Fluoxetine modulates the circadian biological clock via phase-advances of suprachiasmatic nucleus neuronal firing. *Biol. Psychiatry* **60**, 896-899.
- Srkalovic G., Selim M., Rea M.A., Glass J.D. (1994) Serotonergic inhibition of extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclear region assessed using in vivo brain microdialysis. *Brain Res.* **656**, 302-308.
- Tominaga K., Shibata S., Ueki S., Watanabe S. (1992) Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters. *Eur J Pharmacol* 214: 79-84.
- Van Hooft J.A., Vijverberg H.P. (2000). 5-HT₃ receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story? *Trend. Neurosci.* **23**, 605-610.
- Varcoe T.J., Kennaway D.J., Voultzios A. (2003) Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces Per gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* **119**, 192-200.
- Weber E.T., Gannon R.L., Rea M.A. (1998) Local administration of serotonin agonists blocks light-induced phase-advances of the circadian activity rhythm in the hamster. *J. Biol. Rhythms* **13**, 209-218.
- Wright D.E., Seroogy K.B., Lundgren K.H., Davis B.M., Jennes L. (1995) Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **351**, 357-373.
- Yan L., Silver R. (2002) Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1531-1540.
- 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.
- Zylka M.J., Shearman L.P., Weaver D.R., Reppert S.M. (1998) Three Period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**, 1103-1110.

Figures Legend

Figure 1. (A) Daily variations in the concentration of serotonin (5-HT) in the SCN of rats under LD cycle ($n=5$ per ZT). (B) Daily variations in the concentration of 5-HIAA in the SCN of rats under LD cycle ($n=5$ per ZT). For both panels, the solid lines represent the cosinor regressions.

Figure 2. (A) Actograms of wheel-running rhythms in rats under constant dim red light conditions. From top to bottom, animals received i.p. injections at CT6 of saline, 5, 10 and 20 mg/kg fluoxetine. The time of injection is represented by an arrow. The light and dark gray bars on the abscissa represent the subjective day and night, respectively. (B) Dose-dependent behavioral phase-advances in response to i.p. injections of different fluoxetine concentrations at CT6 ($p < 0.001$). Veh, Vehicle; Fluox, Fluoxetine.

Figure 3. Mean expression of *Per1* (A), *Per2* (B), *Rev-erb α* (C) and *Ror β* (D) in the SCN of rats after i.p. injections of vehicle (black bar) or 10 mg/kg fluoxetine (white bar) at CT22+1h and CT22+2h ($n=5$ per treatment). An effect of treatment was observed at CT22+1h for *Per1* ($p < 0.001$) and at CT6+2h for *Ror β* ($p < 0.05$). a, b, and c represent results of the post-hoc tests. At the top of each histogram is represented an example of mRNA level for each treatment. Veh, Vehicle; Fluox, Fluoxetine; A.U., Arbitrary Unit.

Figure 4. Actograms of wheel-running rhythms in rats under constant dim red light conditions. In the left panels, from the top to the bottom, animals received i.p. injections at CT21.5 of vehicle, 10 mg/kg fluoxetine, 5 mg/kg (+)8-OH-DPAT (5-HT_{1A/7} agonist), 5 mg/kg AS-19 (5-HT₇ agonist), 5 mg/kg mCPBG (5-HT₃ agonist) and 3 mg/kg WAY-161503 (5-HT_{2C} agonist). In the right panels, animals received the same i.p. injections at CT21.5 prior to a light pulse (10 min, 300 lux) at CT22. The time of injection/light pulse is represented by an arrow. The light and dark gray bars on the abscissa represent the subjective day and night, respectively. Veh, Vehicle; Fluox, Fluoxetine; Ago, Agonist.

Figure 5. Mean phase-shifts induced by i.p. injections at CT21.5 of vehicle, 10 mg/kg fluoxetine, 5 mg/kg (+)8-OH-DPAT (5-HT_{1A/7} agonist), 5 mg/kg AS-19 (5-HT₇ agonist), 5 mg/kg mCPBG (5-HT₃ agonist) and 3 mg/kg WAY-161503 (5-HT_{2C} agonist) followed by a light pulse (10 min, 300 lux; white bar) or not (black bar) at CT22 ($n=6$ per treatment). We observed an effect of drug treatment ($p < 0.001$), light pulse ($p < 0.001$) and interaction between drug and light pulse ($p < 0.05$). Rats were otherwise maintained under constant dim red light conditions. Veh, Vehicle; Fluox, Fluoxetine; Ago, Agonist.

Figure 6. Mean expression of *Per1* (A), *Per2* (B) and *Ror β* (C) in the SCN of rats after vehicle (black bar), veh/light (dark gray bar), 10 mg/kg fluoxetine (white bar) or 10 mg/kg fluox/light (grey bar) treatments at CT6+1h and CT6+2h ($n=5$ per treatment). An effect of light pulse ($p < 0.001$) and interaction between treatments and light pulse ($p < 0.05$) was observed for *Per1* and at CT6+2h for *Ror β* ($p < 0.05$). For *Per2* a significant effect of time ($p < 0.05$), light pulse ($p < 0.001$) and interaction between treatment and light pulse ($p < 0.05$) was observed. For *Ror β* significant effect was obtained for treatment ($p < 0.01$), light pulse ($p < 0.05$) interactions between treatments and time ($p < 0.001$) and between time and light pulse ($p < 0.001$). a, b, and c represent results of the post-hoc tests. At the top of each histogram is represented an example of the expression of the mRNA level for each treatment. Veh, Vehicle; Fluox, Fluoxetine; A.U., Arbitrary Unit.

Figure 7. Simplified model of the localization of the 5-HT receptor subtypes present in the SCN of rats and effects produced by their targeted activation via specific agonists or by their global activation via fluoxetine administration.

Fluoxetine induces non-photic shifting effects in the SCN during the subjective day (CT6) and reduction of light-induced phase-shifts at night (CT22), both responses being probably due to activation of 5-HT_{1A} and possibly 5-HT₇ receptors in the SCN. The photic-like effects are dependent on 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors activation during subjective night (CT22); however, the localization of 5-HT₃ receptors is not yet established.

5-HT_{1B} receptors are implicated in photic resetting via an inhibition of glutamate and GABA release (Srkalovic et al., 1994; Pickard et al., 1996; 1999; Smith et al., 2001). During the subjective day, 5-HT_{5A} receptors seem to be involved in non-photic effects, at least *in vitro* (Sprouse et al., 2004a). The role of 5-HT_{2A} receptors in the SCN is unknown.

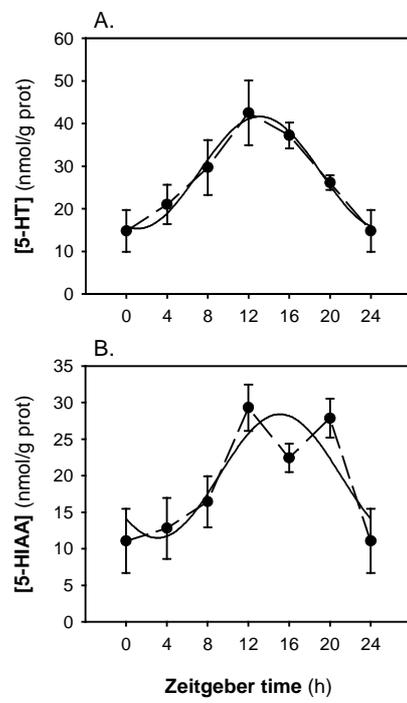


Fig. 1
Cuesta et al.

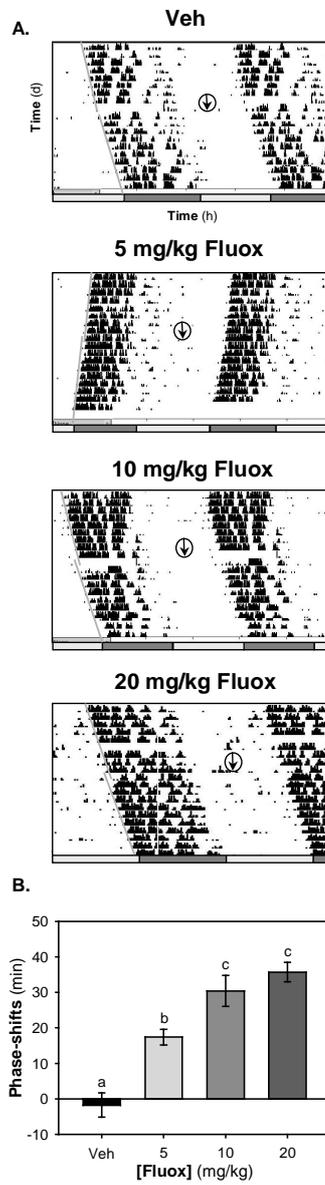


Fig. 2
Cuesta et al.

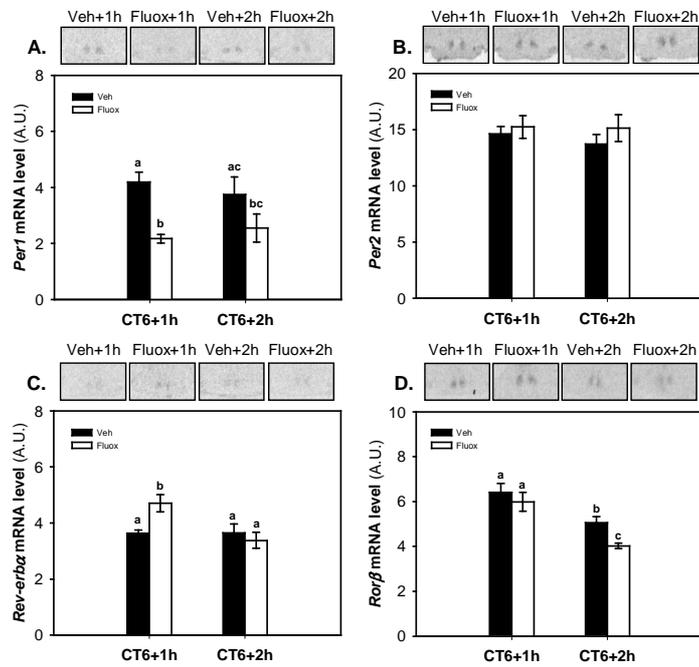


Fig. 3
Cuesta et al.

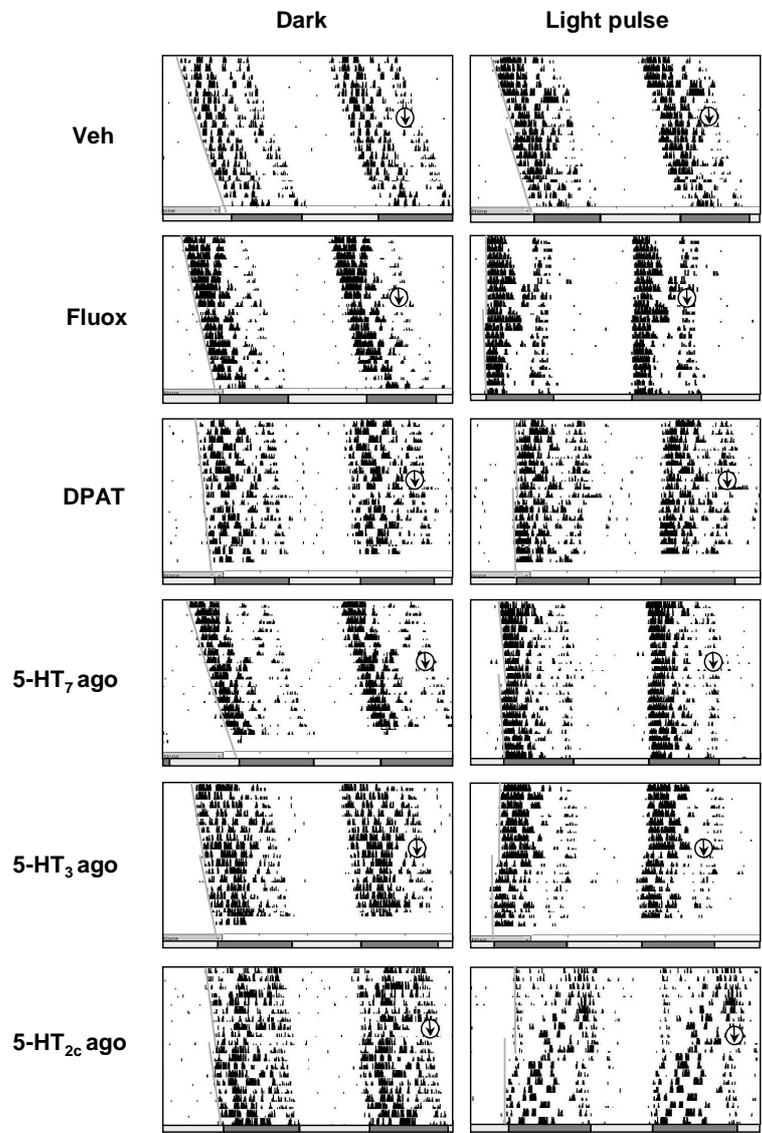


Fig. 4
Cuesta et al.

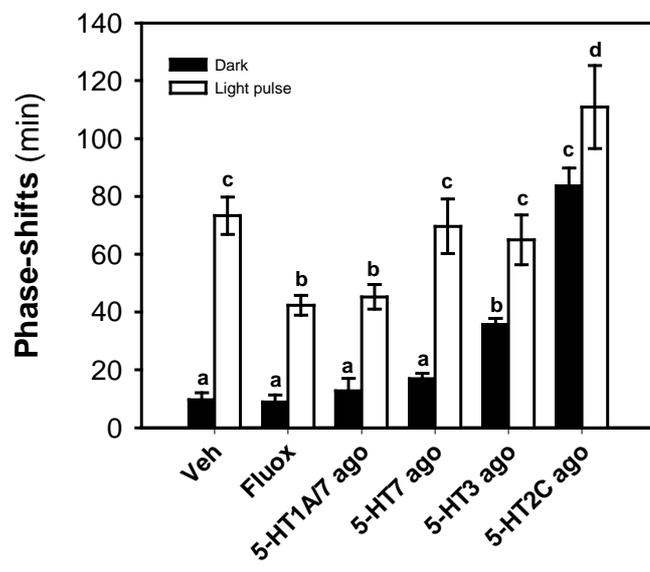


Fig. 5
Cuesta et al.

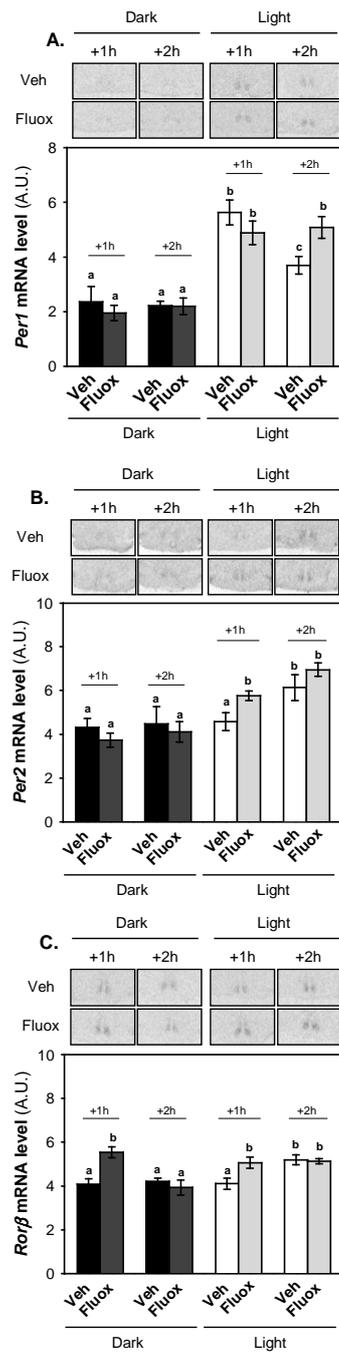


Fig. 6
Cuesta et al.

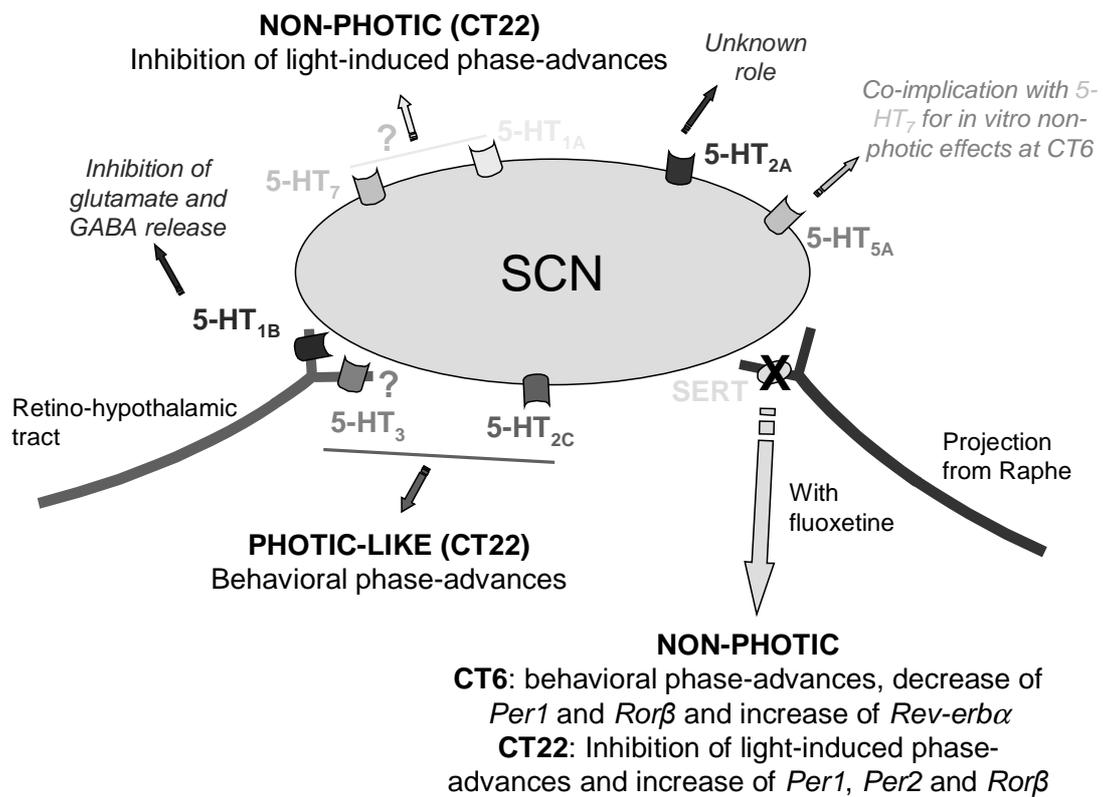


Fig. 7
Cuesta et al.

Table 1. Behavioral and molecular effects of fluoxetine injections on circadian responses of the SCN clock

	CT6 (Dark)	CT22 (Dark)	CT22 with light
Activity rhythm	Phase-advances	No phase-shift	↓ light-induced phase-advances
<i>Per1</i>	↓	=	↑
<i>Per2</i>	=	=	↑
<i>Rev-erbα</i>	↑	=	=
<i>Rorβ</i>	↓	↑	↑

CT, Circadian Time

Table 2. Localization of 5-HT receptor subtypes in the rat, hamster and mouse SCN

Receptor	Rat	Hamster	Mouse
5-HT_{1A}	Yes ^a	Yes ^b	Yes ^c
5-HT_{1B}	Yes ^d	Yes ^e	Yes ^f
5-HT_{2A}	Yes ^g	?	?
5-HT_{2C}	Yes ^g	?	?
5-HT₃	?	?	?
5-HT_{5A}	Yes ^h	Yes ⁱ	?
5-HT₇	Yes ^j	Yes ^a	Yes ^f

?=Unknown. References as follows: a) Wright et al., 1995; b) Duncan et al., 1999; c) Bonaventure et al., 2002; d) Manrique et al., 1994; e) Pickard et al., 1999; f) Belenky and Pickard, 2001; g) Moyer and Kennaway, 1999; h) Oliver et al., 2000; i) Duncan et al. 2000; j) Neumaier et al., 2001.

CHAPITRE 4 - DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail de thèse était double. D'une part, il était nécessaire de réaliser une étude approfondie de la physiologie des rongeurs diurnes, dits crépusculaires, afin d'établir leur statut en tant que modèle diurne. D'autre part, le système sérotonergique étant impliqué dans la régulation du cycle veille/sommeil, il était indispensable d'étudier ce système dans le cadre des rythmes circadiens puisque nous savions qu'il y jouait un rôle important. Ainsi, nous avons pu mieux comprendre comment le système sérotonergique agit de manière différentielle chez les espèces nocturnes et diurnes et plus spécifiquement, nous avons mis en évidence l'importance des sous-types de récepteurs 5-HT impliqués dans les différents effets consécutifs à une activation sérotonergique. Enfin, les différences dégagées par l'étude de la modulation sérotonergique de l'horloge chez une espèce diurne ont ouvert des perspectives biomédicales chez l'Homme, dans le traitement de certaines neuropathologies, dont la dépression.

I. L'Arvicanthis soudanais, un modèle diurne plus proche de l'Homme

1. Une bimodalité partielle

La grande majorité des rongeurs qualifiés de diurnes partagent une particularité en ce qui concerne leur activité locomotrice, puisque celle-ci présente deux pics d'activité, l'un à l'aube et l'autre au crépuscule, accompagnés d'une composante méridienne plus ou moins importante (*Challet et al. 2002 ; Cuesta et al. 2009a ; Garcia-Allegue et al. 1999 ; Katona et Smale 1997 ; Refinetti 2006 ; Schumann et al. 2005 ; Weinert et al. 2007*). Toutefois, cette activité bimodale n'est pas l'apanage des Mammifères, puisque la Drosophile présente également deux pics d'activité (*Chang 2006*). Bien entendu, tous les Mammifères ne sont pas bimodaux, comme le Cheval et le Mouton par exemple (*Piccione et al. 2005*).

Hormis l'activité locomotrice, les rongeurs diurnes présentent d'autres paramètres bimodaux, la température corporelle (*Cuesta et al. 2009a ; McElhinny et al. 1997 ; Refinetti 1996*) et la corticostérone plasmatique (*Verhagen et al. 2004*). Une fois encore, ces paramètres ne sont pas bimodaux chez tous les Mammifères (*Leproult et al. 2005 ; Piccione et al. 2005 ; Zolovick et al. 1966*). Étant donné que les variations d'activité locomotrice, de température corporelle et de corticostérone plasmatique sont étroitement liées (*Challet et al. 1995 ;*

Coleman et al. 1998 ; Refinetti et Menaker 1992), il n'est pas surprenant que ces paramètres soient tous bimodaux chez les rongeurs diurnes.

La bimodalité de ces paramètres pourrait résulter d'une adaptation aux conditions environnementales. En effet, des espèces comme le Rat du Nil et l'Arvicanthis soudanais sont originaires d'Afrique où la température extérieure atteint des valeurs très élevées en milieu de jour. Il est donc raisonnable de penser que ces espèces se protègent de la chaleur pendant cette période, ce qui se répercute sur leur activité locomotrice qui se trouve alors fortement réduite au moment où il fait le plus chaud. Les données obtenues dans la nature sont parfaitement compatibles avec cette hypothèse pour l'Arvicanthis soudanais (Dr B. Sicard, communication personnelle), puisque cette espèce a également une activité locomotrice bimodale dans son habitat naturel. De manière surprenante, le Rat du Nil adopte une activité diurne unimodale dans la nature (*Blanchong et al. 1999; Blanchong et Smale 2000*). De plus, des espèces comme le Degu du Chili ou la Gerbille mongole ont également une activité bimodale en laboratoire alors que les températures dans leurs lieux de vie respectifs sont loin d'être aussi élevées qu'en Afrique. D'autres facteurs environnementaux sont donc probablement responsables de cette bimodalité, comme se protéger d'éventuels prédateurs. Cependant, cela n'explique pas la persistance de la bimodalité en laboratoire, puisque la majorité des facteurs environnementaux sont contrôlés et constants, comme c'est le cas pour la température.

2. Quelques mots sur l'effet « roue »

Un autre paramètre influe sur l'activité locomotrice des rongeurs diurnes, il s'agit de l'accès à une roue. Ce phénomène, détaillé dans l'introduction, provoque un déplacement de la fenêtre temporelle de l'activité générale qui devient nocturne et cela chez quasiment tous les rongeurs diurnes étudiés, comme la Gerbille mongole, le Degu du Chili et le Rat du Nil (*Blanchong et al. 1999 ; Kas et Edgar 1999 ; Ocampo-Garcés et al. 2005 ; Weinert et al. 2007*). Ce switch de l'activité générale est probablement lié à l'aspect motivationnel de la course dans la roue, mais cela n'explique pas l'origine de cette inversion qui, de plus, persiste jusqu'à ce que la roue soit retirée. En effet, on aurait pu imaginer que la nouveauté (la roue), soit responsable de ce switch. Selon cette hypothèse, l'inversion du cycle veille/sommeil devrait s'estomper rapidement, ce n'est cependant pas le cas. De plus, il est difficile d'imaginer quel facteur, présent dans le milieu naturel, pourrait être similaire à ces conditions expérimentales très particulières.

Toutefois, l'Arvicanthis soudanais ne présente pas cette inversion de la fenêtre temporelle de l'activité générale, que la roue soit accessible dès le début de l'expérience (*Challet et al.*

2002) ou seulement après quelques semaines (*Cuesta et al. 2009a*). Cette espèce n'est donc pas sensible à ce facteur « environnemental » et présente donc un avantage en tant que modèle d'étude utilisant l'activité locomotrice. En effet, les enregistrements de l'activité de roue sont généralement plus fiables et plus faciles à analyser que ceux obtenus à partir de l'activité générale.

3. Et l'Homme dans tout cela ?

L'étude des espèces diurnes a notamment pour but de développer des modèles plus proches de l'Homme, puisqu'il est généralement admis que ce dernier est une espèce diurne, étant actif le jour et dormant la nuit. Néanmoins, il existe des variations inter-individuelles, particulièrement en fonction de l'âge (*Roenneberg et al. 2004*). Cette étude montre que sur une population de 25 000 personnes, le MSF (midpoint of sleep on free days) qui correspond à l'heure à laquelle la personne a effectué la moitié de sa durée de sommeil, arrive beaucoup plus tardivement (jusqu'à 5h30 du matin) chez les jeunes gens (20 ans en moyenne) que chez les autres (le MSF diminuant avec l'augmentation de l'âge). En d'autres termes, une partie de la population montre une nette tendance à se coucher et à se lever très tard, et l'on peut considérer qu'ils ne sont donc pas totalement diurnes, mais ont un profil intermédiaire avec une composante d'activité pendant le jour et une autre pendant la nuit. Bien entendu, la question se pose de savoir si ces jeunes gens se couchent tard uniquement parce qu'ils ont des activités nocturnes en rapport avec leur âge, mais apparemment des résultats similaires seraient obtenus chez des jeunes adultes ayant un mode de vie plus tranquille (sans sorties nocturnes). On peut donc dire que même chez l'Homme, le caractère diurne peut présenter une relative bimodalité et être soumis à des fluctuations. Ces résultats doivent cependant être considérés avec précaution, en raison de l'influence possible de l'éclairage artificiel sur l'horloge circadienne principale pendant la nuit.

4. L'origine de la bimodalité

Les mécanismes sous-tendant la bimodalité sont très peu connus. Quelques hypothèses ont été proposées impliquant l'horloge circadienne principale. L'une d'entre elles dérive d'un modèle décrit il y a plus de trente ans et concerne un autre phénomène, le « splitting » (*Pittendrigh et Daan 1976*). Le splitting est observé chez certains Hamsters syriens placés en LL. Leur activité locomotrice se divise initialement en deux composantes qui dérivent l'une par rapport à l'autre (car chacune possède une période endogène différente), avant de se coupler à 12 h d'intervalle. Le modèle, proposé pour expliquer ce phénomène, était que les deux

composantes (du matin et du soir) sont contrôlées par deux oscillateurs différents (du matin et du soir). On sait maintenant que le splitting résulte d'un fonctionnement en antiphase des deux SCN (*De la Iglesia et al. 2000*). L'hypothèse des deux oscillateurs a été reprise pour expliquer la bimodalité de l'activité locomotrice et semble être valable chez la Drosophile (*Chang 2006 ; Grima et al. 2004*). Chez les Mammifères, ces deux groupes de neurones oscillants sont encore à mettre clairement en évidence car ils pourraient jouer un rôle critique dans l'adaptation aux facteurs environnementaux aboutissant à la bimodalité. Une étude, réalisée chez la Souris, semble aller dans la direction de cette hypothèse (*Inagaki et al. 2007*). En effet, les SCN posséderaient des groupes distincts de cellules oscillantes dont la rythmicité varierait suite à des changements de photopériode et en fonction de l'aube et du crépuscule. Une autre hypothèse serait que les deux pics d'activité sont contrôlés par un seul groupe de cellules oscillantes, mais que les structures cibles de ces cellules intervenant dans la régulation de l'activité locomotrice, délivreraient des signaux bimodaux (par exemple, elles seraient transitoirement inhibées en milieu de journée).

5. L'Arvicanthis soudanais, un modèle à la physiologie diurne

Bien que certains paramètres physiologiques adoptent un profil rythmique bimodal chez l'Arvicanthis soudanais, leurs valeurs maximales sont en opposition de phase avec le Rat, fournissant un premier indice quant à la possible diurnalité de notre modèle. De plus, la première étude de cette thèse a montré que certains paramètres adoptent une rythmicité unimodale, souvent en opposition de phase avec celle du Rat (*Cuesta et al. 2009a*).

- La glycémie oscille de manière unimodale chez l'Arvicanthis soudanais et présente des valeurs maximales à la fin de la nuit, comme chez l'Homme (*Bolli et al. 1984*). Ce rythme est en opposition de phase avec celui trouvé chez le Rat (*Cailotto et al. 2005; Challet et al. 2004; La Fleur et al. 1999*). Dans les deux cas, les valeurs maximales surviennent peu de temps avant le début de l'activité locomotrice, ce qui permettrait aux animaux de se préparer à cette période active qui nécessite de l'énergie. Par contre, chez certaines espèces diurnes, comme le Cheval ou le Mouton, les valeurs maximales de glycémie ont lieu respectivement en milieu de nuit et au crépuscule (*Piccione et al. 2005*), ce qui ne corrobore pas l'hypothèse énoncée ci-dessus. Il est possible que ces espèces présentent un autre type de régulation métabolique, notamment le Mouton qui est un ruminant et dont le système digestif est très différent des non-ruminants, sous-tendant de possibles différences au niveau métabolique.

- La leptinémie présente également des variations unimodales chez l'Arvicanthis soudanais et la Gerbille mongole, avec un pic survenant en milieu de jour (*Cuesta et al. 2009a* ; *Karakaş et al. 2005*), alors qu'il est observé en milieu de nuit chez le Rat (*Bodosi et al. 2004* ; *Cuesta et al. 2009a* ; *Kalsbeek et al. 2001*). Chez les autres espèces diurnes, les résultats sont plus controversés, car la prise alimentaire interfère avec les taux de leptine circulante. Ainsi, on ne trouve pas de rythmicité chez le Chien (*Canis lupus*), le Mouton et le Cheval, mais seulement des pics post-prandiaux (*Gordon et McKeever 2005* ; *Ishioka et al. 2005* ; *Marie et al. 2001*). D'autres études, menées chez l'Homme et le Cheval, ont noté la présence d'un rythme avec des valeurs maximales pendant la nuit, comme chez les espèces nocturnes (*Licinio et al. 1998* ; *Piccione et al. 2004*). Cependant, ces derniers résultats ne sont pas cohérents avec l'action anorexigène de la leptine, alors que les données obtenues chez l'Arvicanthis soudanais et le Rat sont plus en synergie avec cet effet. On peut donc s'interroger sur le rôle du contrôle circadien de la leptine par les SCN, puisque la leptinémie est aussi régulée par l'alimentation (*Kalsbeek et al. 2001*). Il est possible que le rythme de leptine participe à un phénomène plus général de régulation circadienne du métabolisme.
- Le contenu en 5-HT présente une rythmicité journalière unimodale dans l'hippocampe et les SCN de l'Arvicanthis soudanais, de la Gerbille mongole (seulement étudié pour l'hippocampe) et du Rat (*Cuesta et al. 2008* ; *2009a* ; *2009b* ; *Daszuta et Barrit 1982* ; *Matsumoto et al. 1981* ; *Poncet et al. 1993*). Dans l'hippocampe, les valeurs maximales surviennent la nuit chez l'Arvicanthis soudanais et la Gerbille mongole, alors qu'elles ont lieu pendant le jour chez le Rat. Dans les SCN, on trouve également une opposition de phase entre les espèces diurnes et nocturnes, avec respectivement un pic de jour et un pic de nuit. Dans l'hippocampe, la 5-HT module de nombreuses fonctions comme la mémoire, la cognition, les comportements émotionnels et les réponses liées au stress (*Cassel et Jeltsch 1995* ; *Dremencov et al. 2003* ; *Hensler 2006*). Il est donc logique de penser que les valeurs maximales de 5-HT qui surviennent en antiphase entre rongeurs diurnes et nocturnes (au moment où ils dorment), favorisent la consolidation de la mémoire qui a apparemment lieu pendant la période de repos. Dans les SCN, le rythme de 5-HT indiquerait notamment que l'organisme entre en phase de veille et encore une fois, le moment où surviennent les valeurs maximales de 5-HT dans cette structure, concorde avec le caractère diurne ou nocturne des espèces étudiées.

Néanmoins, tous les paramètres rythmiques ne sont pas en opposition de phase entre espèces nocturnes et diurnes. Les rythmes journaliers de mélatonine plasmatique, de dopamine dans l'hippocampe ou les oscillations des gènes horloges dans les SCN sont en phase chez l'Arvicanthis soudanais et le Rat (*Caldelas et al. 2003 ; Cuesta et al. 2009a ; Garidou et al. 2002 ; Honma et al. 1998 ; Vivanco et al. 2007 ; Yan et al. 1999*). Cependant, un certain nombre de paramètres dépendant de l'état de veille ou de sommeil de l'animal présentent une rythmicité unimodale et sont en opposition de phase entre l'Arvicanthis soudanais et le Rat.

Il apparaît donc clairement, qu'en dépit d'une bimodalité partielle, l'Arvicanthis soudanais peut être considéré comme une espèce à la physiologie diurne et représente donc un bon modèle d'étude dont l'organisation temporelle est plus proche de celle de l'Homme que celles des rongeurs nocturnes traditionnellement étudiés.

II. Le système sérotonergique, modulateur de l'horloge circadienne principale

1. Synchronisation non-photique

a. Le Rat, un rongeur nocturne presque comme les autres

Le système sérotonergique a été de nombreuses fois décrit comme un facteur non-photique agissant sur les SCN en milieu de jour subjectif, chez le Hamster syrien et la Souris. Des injections systémiques ou locales d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ (le 8-OH-DPAT et le (+)8-OH-DPAT), pendant cette période, induisent des avances de phase de l'activité locomotrice, couplées à une inhibition transitoire de l'expression de deux gènes horloges, *Per1* et *Per2* dans les SCN (*Caldelas et al. 2005 ; Cutrera et al. 1994 ; 1996 ; Ehlen et al. 2001 ; Horikawa et al. 2000 ; Horikawa et Shibata 2004 ; Mendoza et al. 2008*). Par contre, des agonistes non spécifiques, comme la quipazine (5-HT₃ > 5-HT_{1A} > 5-HT_{1B}), n'ont pas d'effet de déphasage pendant le jour subjectif (*Bobrzynska et al. 1996*). *In vitro*, des applications de 8-OH-DPAT et de fluoxétine en milieu de jour subjectif provoquent des avances de phase de l'activité électrique des SCN de Souris (*Prosser 2003 ; Prosser et al. 2006*).

Chez le Rat, une seule étude a montré que des injections systémiques de 8-OH-DPAT et de quipazine, réalisées en milieu de jour subjectif, entraînent des avances de phases comportementales (Edgar *et al.* 1993). Par contre, *in vitro*, des avances de phase de l'activité électrique sont observées après application, en milieu de jour subjectif, de 5-HT elle-même, de quipazine, de 5-CT, de 8-OH-DPAT et de fluoxétine (Medanic et Gillette 1992 ; Prosser *et al.* 1990 ; 1993 ; 2006 ; Shibata *et al.* 1992 ; Sprouse *et al.* 2006). Devant cette multitude de résultats *in vitro*, il est surprenant qu'une seule étude ait mis en évidence, *in vivo*, les effets non-photiques du système sérotonergique chez le Rat. Cela est peut-être dû au fait que le Rat présente une particularité qui n'a pas été retrouvée jusqu'à présent chez le Hamster syrien et la Souris. En effet, de nombreux agonistes, plus ou moins spécifiques des récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT₃ (quipazine, DOI, mCPP, mCPBG), injectés de manière systémique ou locale, n'ont pas d'effet de déphasages pendant le jour subjectif. Néanmoins, ils provoquent des déphasages pendant la nuit subjective, similaires à ceux obtenus en réponse à des créneaux de lumière (Graff *et al.* 2005 ; 2007 ; Kalkowski et Wollnik 1999 ; Kennaway *et al.* 1996 ; Kennaway et Moyer 1998 ; Kohler *et al.* 1999). De plus, au niveau moléculaire, ces agonistes agissent comme la lumière, en provoquant une augmentation transitoire de l'expression de *Per1*, de *Per2* et de FOS dans les SCN (Graff *et al.* 2007 ; Varcoe *et al.*, 2003 ; Varcoe et Kennaway 2008). La modulation sérotonergique de l'horloge circadienne principale du Rat est donc paradoxale, puisqu'elle présente à la fois des caractéristiques non-photiques largement mises en évidence *in vitro*, et des propriétés de mimétisme photique, massivement démontrées *in vivo*.

La troisième étude de cette thèse a permis de mettre en évidence la capacité du système sérotonergique du Rat à agir comme un facteur non-photique *in vivo* (Cuesta *et al.* 2009b). Pour cela, nous avons réalisé des injections systémiques de fluoxétine qui, en bloquant le transport de recapture de la sérotonine, permettent l'augmentation de la quantité de sérotonine dans la fente synaptique, quand celle-ci est libérée. Ainsi, par ce mécanisme, la fluoxétine permet une activation de tous les récepteurs sérotonergiques, contrairement aux agonistes qui activent spécifiquement un seul (ou plusieurs) sous-type(s) de récepteur(s). Nous avons démontré que les injections de fluoxétine, réalisées en milieu de jour subjectif, provoquent des avances de phase de l'activité locomotrice d'une manière dose-dépendante. Celles-ci sont toutefois moins importantes que celles obtenues après des injections de 8-OH-DPAT chez le Hamster syrien et la Souris (~30 min vs. ~1 h ; Cutrera *et al.* 1994 ; 1996 ; Horikawa et Shibata 2004). Cette plus faible amplitude expliquerait peut-être pourquoi si peu d'études ont mis en évidence ces effets non-photiques chez le Rat. Au niveau moléculaire, nous avons

également démontré que la fluoxétine, injectée en milieu de jour subjectif, induit dans les SCN, une diminution transitoire du niveau d'ARNm de *Per1*, mais pas de celui de *Per2*. Ces résultats sont partiellement en accord avec ceux obtenus chez le Hamster syrien (*Caldelas et al. 2005 ; Horikawa et al. 2000 ; Mendoza et al. 2008*). Par contre, notre étude met en exergue, pour la première fois, l'implication de deux autres gènes horloge, *Rev-erba* et *Rorβ*, dont la transcription est respectivement activée et inhibée dans les SCN après une injection de fluoxétine. Ces deux gènes, en plus de leur implication dans les boucles secondaires relatives à la genèse des oscillations circadiennes (*Dardente et Cermakian 2007*), paraissent également participer à la synchronisation des SCN (*Masana et al. 2007 ; Meng et al. 2008*). Il n'est donc pas surprenant qu'ils puissent être impliqués dans les mécanismes de régulation non-photique de l'horloge circadienne principale.

Les résultats obtenus grâce à cette étude permettent donc de placer le système sérotonergique comme un facteur non-photique agissant de jour chez le Rat, comme chez le Hamster syrien et la Souris.

b. Influence sérotonergique des SCN chez un rongeur diurne

Alors que l'influence non-photique de la 5-HT a été très étudiée chez les rongeurs nocturnes, nous avons été les premiers à mettre en évidence le rôle de ce neurotransmetteur sur l'horloge suprachiasmatique d'un rongeur diurne, l'Arvicanthis soudanais (*Cuesta et al. 2008*). La deuxième étude de cette thèse a révélé un grand nombre de différences entre cette espèce et les rongeurs nocturnes.

- Des injections systémiques de (+)8-OH-DPAT provoquent des avances de phase dose-dépendantes de l'activité locomotrice chez l'Arvicanthis soudanais, essentiellement pendant la nuit subjective, et de moindre manière en début et en fin de jour subjectif. Par contre, cet agoniste ne provoque aucun effet en milieu de jour subjectif, alors que c'est à ce moment qu'il agit chez les rongeurs nocturnes (*Cutrera et al. 1994 ; 1996 ; Horikawa et Shibata 2004*). Ces résultats démontrent que la fenêtre de sensibilité circadienne pour cet agoniste est opposée entre rongeurs diurnes et nocturnes. De plus, il apparaît que ces déphasages sont dépendants du cycle veille/sommeil, puisque dans les deux cas, ils surviennent essentiellement pendant la période de repos des animaux. Il apparaît, par contre, que les SCN de l'Arvicanthis soudanais sont moins sensibles à cet agoniste puisque les déphasages observés sont plus faibles que ceux obtenus chez

les espèces nocturnes (~35 min vs. ~1 h ; *Cutrera et al. 1994 ; 1996 ; Horikawa et Shibata 2004*).

- La fluoxétine provoque également des avances de phase de l'activité locomotrice, quand elle est injectée aux transitions obscurité/lumière et lumière/obscurité subjectives. Il est raisonnable de penser que cette molécule présenterait une courbe de réponse de phase similaire à celle du (+)8-OH-DPAT chez l'Arvicanthis soudanais et que ses effets seraient donc opposés, en terme de fenêtre de sensibilité, à ceux obtenus *in vivo*, chez le Rat (*Cuesta et al. 2009b*). De manière surprenante, la fluoxétine n'a jamais été testée, *in vivo*, en tant que facteur non-photique chez le Hamster syrien et la Souris, alors que ses propriétés anti-dépressives et son action sur l'horloge en font une molécule très importante dont nous reparlerons ultérieurement.
- Au niveau moléculaire, la fluoxétine et le (+)8-OH-DPAT, injectés aux transitions obscurité/lumière et lumière/obscurité subjectives, n'induisent pas de modification des niveaux d'expression de *Per1*, *Per2*, *Rev-erba*, *Rev-erbβ*, *Rora* et *Rorbβ* dans les SCN de l'Arvicanthis soudanais. Ceci représente une autre différence entre rongeurs nocturnes et diurnes, puisque chez le Hamster syrien (pour le (+)8-OH-DPAT) et le Rat (pour la fluoxétine), ces composés inhibent l'expression d'une partie de ces gènes (*Caldelas et al. 2005 ; Cuesta et al. 2009b ; Horikawa et al. 2000 ; Mendoza et al. 2008*). Cependant, cette différence vient probablement du fait que les traitements ne sont pas administrés aux même temps circadiens (CT6 vs. CT0 et CT12). Cette absence d'effet sur l'expression des gènes horloges peut être expliquée de plusieurs façons. Premièrement, nous avons observé le niveau d'expression de ces gènes une heure après l'injection de (+)8-OH-DPAT ou de fluoxétine. Il est possible que l'induction et/ou l'inhibition du niveau d'ARNm de ces gènes survienne(nt) plus tardivement, nous ayant ainsi empêché d'observer un effet chez cette espèce. Par exemple chez le Hamster syrien, l'inhibition de la transcription de *Per1* et de *Per2* est observée deux heures après l'injection de 8-OH-DPAT ou de (+)8-OH-DPAT, alors qu'aucun effet n'est visible une heure après l'injection (*Horikawa et al. 2000*). Deuxièmement, il est possible que ces molécules agissent au niveau post-traductionnel en modulant la phosphorylation des protéines. En effet, chez la Drosophile, l'activation des récepteurs d5-HT_{1B} inhibe la phosphorylation de TIM, une protéine horloge clé chez cette espèce (*Yuan et al. 2005*). Chez les Mammifères, le récepteur 5-HT_{1A}, une fois activé, affecte les propriétés de phosphorylation de la GSK3β, protéine qui joue un rôle dans la régulation du système circadien (*Li et al. 2004 ; Yin et al.*

2006). Troisièmement, l'expression d'autres gènes horloges pourraient être affectée après les injections de (+)8-OH-DPAT et de fluoxétine.

Ces résultats démontrent clairement que la modulation non-photique de l'horloge circadienne principale, suite à une activation sérotonergique, est différente entre rongeurs nocturnes et diurnes. Quand on observe les effets des différents facteurs non-photiques (Tableau 3), on se rend compte que certains d'entre eux surviennent chez les espèces nocturnes et diurnes, indépendamment du cycle veille-sommeil (GABA et mélatonine), alors que d'autres paraissent liés à ce cycle (hyperactivité, 5-HT, créneau d'obscurité). Ces données suggèrent donc que les facteurs non photiques liés au cycle veille/sommeil pourraient avoir un rôle important dans l'établissement et/ou le maintien de la diurnalité et de la nocturnalité. L'étude d'autres espèces diurnes semble indispensable pour tenter de généraliser à la diurnalité les résultats obtenus avec l'Arvicanthis soudanais.

Type de facteur	Rongeurs nocturnes		Rongeurs diurnes	
	Activité locomotrice	Expression <i>Per1</i> et <i>Per2</i>	Activité locomotrice	Expression <i>Per1</i> et <i>Per2</i>
Lumière	1. Retards de phase : début de nuit (veille) 2. Avances de phase : fin de nuit (veille)	Augmentation en début et fin de nuit	1. Retards de phase : début de nuit (sommeil) 2. Avances de phase : fin de nuit (sommeil)	Augmentation en début et fin de nuit
Hyperactivité	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	Avance de phase : début de nuit (sommeil)	?
5-HT	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	Avances de phase : nuit (sommeil)	Pas d'effet
NPY	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	?	?
GABA	Avances de phase : milieu de jour (sommeil)	Diminution	Retards de phase : milieu de jour (veille)	Diminution <i>Per2</i>
Créneau d'obscurité	Avances de phase : jour (sommeil)	Diminution	Avances de phase : nuit (sommeil)	Diminution
Mélatonine	Avances de phase : fin de jour (sommeil)	Pas d'effet	Avances de phase : fin de jour (veille)	?

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets des différents facteurs synchroniseurs de l'horloge chez les espèces nocturnes et diurnes.

c. Récepteurs 5-HT impliqués dans la synchronisation non-photique

Comme nous venons de le voir, chez les rongeurs nocturnes, le 8-OH-DPAT et son énantiomère positif sont les principaux agonistes responsables des avances de phase de l'activité locomotrice, observées suite à des injections durant le jour subjectif. Ces composés présentent une affinité pour deux sous-types de récepteurs, 5-HT_{1A} et 5-HT₇. Ces deux récepteurs étant présents dans les SCN des espèces nocturnes (*Belenky et Pickard 2001 ; Bonaventure et al. 2002 ; Duncan et al. 1999 ; Neumaier et al. 2001 ; Wright et al. 1995*), de nombreux travaux se sont penchés sur l'implication de l'un de ces deux sous-types de récepteurs et les conclusions tirées de ces études sont, à ce jour, hautement controversées. Les récepteurs 5-HT_{1A} seraient impliqués dans les effets non-photiques, puisque des injections d'antagonistes bloquent les effets de déphasages normalement induits par des injections de 8-OH-DPAT pendant le jour subjectif (*Tominaga et al. 1992*). De plus, les Souris mutantes pour ces récepteurs ne présentent plus de déphasage en réponse au 8-OH-DPAT (*Smith et al. 2008*). Les récepteurs 5-HT₇ seraient également responsables de ces effets non-photiques, car l'utilisation d'antagonistes et de Souris mutantes pour ces récepteurs fournissent le même type de résultats que ceux obtenus avec les récepteurs 5-HT_{1A} (*Duncan et al. 2004 ; Ehlen et al. 2001 ; Gardani et Biello 2008*). Il semblerait donc que ces deux récepteurs soient indispensables pour assurer la synchronisation non-photique chez les espèces nocturnes. De plus, il semble, du moins chez le Rat, que les récepteurs 5-HT_{5A} participeraient aussi aux effets non-photiques (*Sprouse et al. 2004*). Cependant, ce dernier résultat, obtenu *in vitro*, est à confirmer *in vivo* et chez d'autres espèces que le Rat.

Chez les espèces diurnes, nous savons que le (+)8-OH-DPAT agit en provoquant des avances de phases de l'activité locomotrice pendant la nuit subjective. Des résultats préliminaires montrent chez l'Arvicanthis soudanais que les injections d'antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A} (WAY-100635) ou 5-HT₇ (SB-269970) bloquent totalement les effets de déphasages provoqués par des injections de (+)8-OH-DPAT (*Cuesta et al. non publié*) et n'ont pas d'effet quand ils sont injectés seuls. Comme pour les espèces nocturnes, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ seraient donc impliqués dans la synchronisation non-photique de l'horloge circadienne principale chez l'Arvicanthis soudanais.

Ces deux sous-types de récepteurs semblent donc être les médiateurs principaux des effets de synchronisation sérotonergique de type non-photique dans les SCN. Cependant, bien que ces récepteurs soient présents dans les SCN, ils sont également exprimés dans le NRM, le NRD et les IGL (*Bonaventure et al. 2002 ; Chalmer et Watson 1991 ; Duncan et Hensler 2002*),

structures cérébrales qui participent aussi à la modulation non-photique des SCN. En effet, en milieu de jour subjectif, des injections de 8-OH-DPAT dans les IGL ou le NRD, ainsi qu'une stimulation électrique du NRD ou du NRM, provoquent des avances de phases de l'activité locomotrice chez les espèces nocturnes (*Challet et al. 1998 ; Duncan et al. 2004 ; Meyer-Berstein et Morin 1999*). Ces structures et les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ qu'elles expriment sont donc impliqués dans la synchronisation non-photique. Cependant, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ situés dans les SCN seraient les cibles principales pour l'obtention des effets non-photiques, car des injections locales de 8-OH-DPAT dans les SCN du Hamster syrien entraînent les déphasages comportementaux (*Challet et al. 1998 ; Ehlen et al. 2001*).

Ces deux récepteurs agissent donc en synergie, alors que les voies intracellulaires principales qu'ils activent sont opposées. En effet, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ sont respectivement couplés négativement et positivement à l'AC. Il est fort probable qu'au sein des SCN, ces récepteurs soient situés sur des types cellulaires différents. D'une part, des études mettent en évidence que l'activation des récepteurs 5-HT₇ inhibe la libération de GABA ou le courant induit par le GABA dans le NRD du cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) et les SCN du Rat (*Kawahara et al. 1994 ; Roberts et al. 2004*). D'autre part, dans les SCN du Hamster syrien, l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} provoque une diminution de la libération de glutamate (*Srkalovic et al. 1994*). De plus, *in vivo*, des applications locales de 5-HT, de 5-CT et de 8-OH-DPAT inhibent l'activité électrique globale des SCN *via* l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ (*Ying et Rusak 1994 ; 1997*). Ces résultats renforcent donc l'implication de ces deux sous-types de récepteurs et suggèrent une possible localisation des récepteurs 5-HT_{1A} dans les neurones à glutamate (ou dans des neurones connectés à ces neurones), alors que les récepteurs 5-HT₇ seraient exprimés dans les neurones à GABA. De plus, puisque l'activation de ces récepteurs par le 8-OH-DPAT aboutit à une diminution de la libération de glutamate et de GABA (*Kawahara et al. 1994 ; Srkalovic et al. 1994*), il est possible que les neurones glutamatergiques et GABAergiques des SCN innervent des cibles différentes, étant donné qu'ils libèrent des neurotransmetteurs aux effets opposés.

Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ sont donc les médiateurs de la synchronisation sérotonergique de type non-photique dans les SCN chez les espèces nocturnes et diurnes. Cependant, la caractérisation et la localisation précise des deux acteurs de cette synchronisation sont inconnues pour le moment chez les espèces diurnes, comme l'Arvicanthis soudanais, et encore mal caractérisées chez les espèces nocturnes.

2. Mimétisme photique du système sérotonergique

Nous avons précédemment énoncé que le système sérotonergique du Rat possédait la particularité, pendant la nuit subjective, d'induire au niveau comportemental et moléculaire des effets similaires à ceux de la lumière (*Graff et al. 2005 ; 2007 ; Kalkowski et Wollnik 1999 ; Kennaway et al. 1996 ; Kennaway et Moyer 1998 ; Kohler et al. 1999 ; Varcoe et al., 2003 ; Varcoe et Kennaway 2008*). Dans la troisième étude de cette thèse, nous avons mis en évidence les propriétés d'une partie du système sérotonergique, capable de mimer les effets de la synchronisation photique chez le Rat (*Cuesta et al. 2009b*).

D'une part, ni les injections de fluoxétine, ni l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ via des injections de (+)8-OH-DPAT ou d'un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT₇ (AS19), ne produisent d'avances de phase de l'activité locomotrice en fin de nuit subjective. Cela signifie que les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ ne sont pas impliqués dans les effets de type photique. De plus, une activation globale de tous les récepteurs 5-HT via la fluoxétine n'aboutit pas à une réponse de type photique, renforçant l'idée que le système sérotonergique véhicule surtout des informations non-photiques vers l'horloge suprachiasmatique du Rat.

D'autre part, nous avons confirmé l'implication des récepteurs 5-HT₃ et 5-HT_{2C} dans les effets de type photique. En effet, en fin de nuit subjective, des injections de mCPBG (agoniste 5-HT₃ déjà testé; *Graff et al. 2007*) et de WAY-161503 (agoniste 5-HT_{2C} testé ici pour la première fois et plus spécifique que les autres agonistes classiquement utilisés, comme le DOI ou le mCPP; *Kennaway et Moyer 1998 ; Varcoe et Kennaway 2008*) provoquent des avances de phase de l'activité locomotrice chez le Rat. Les récepteurs 5-HT₃ agiraient au niveau présynaptique, en augmentant la quantité de glutamate libéré par les terminaisons du RHT (*Graff et al 2005 ; 2007*). Cependant, son expression dans les SCN n'a pas été déterminée pour le moment, bien qu'une énucléation (provoquant une dégénérescence du RHT) empêche l'apparition des avances de phases induites par des injections de quipazine (*Graff et al. 2005*). Cet argument suggère une localisation présynaptique de ce sous-type de récepteur mais n'apporte pas de preuve directe de leur présence dans les SCN. De plus, il faut garder à l'esprit que l'énucléation peut provoquer des modifications de l'expression des différents sous-types de récepteurs présents dans les SCN pouvant également expliquer l'absence d'effet. Les récepteurs 5-HT_{2C} sont, eux, exprimés dans les SCN du Rat (*Moyer et Kennaway 1999*). Ils seraient situés au niveau postsynaptique, car des applications d'agonistes des récepteurs 5-HT_{2A/2C} (DOI), en début de nuit subjective, induisent une augmentation de l'expression de *Per1* dans des explants de SCN de Rats (*Varcoe et Kennaway 2008*). Puisque

ces explants ne possèdent plus d'afférence, les effets induits proviennent obligatoirement de récepteurs postsynaptiques et peuvent donc être attribués à l'activation des récepteurs 5-HT_{2C}. Cependant, les récepteurs 5-HT_{2A}, dont le rôle est encore inconnu, pourraient également être impliqués puisque le DOI possède une affinité pour ce sous-type de récepteur qui est lui-aussi présent dans les SCN du Rat (*Moyer et Kennaway 1999*).

Alors que les effets de type photique ont été décrits maintes fois chez le Rat, l'absence de travaux étudiant les agonistes responsables de ces effets chez d'autres rongeurs, comme le Hamster syrien et la Souris, est surprenant. D'une part, aucune étude n'a détecté la présence des récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT₃ chez ces rongeurs et, d'autre part, il n'existe qu'une étude ayant observé les effets d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (Ro-600175) chez le Hamster syrien (*Gannon et Millan 2006*). Cependant, ce n'est pas l'effet direct sur les SCN qui a été étudié mais la modulation de la synchronisation photique. Celle-ci n'est d'ailleurs pas altérée en réponse à des injections de ce composé. La seule étude montrant des effets que l'on pourrait peut-être qualifier de type photique a utilisé un agoniste aux propriétés particulières, le BMY 7378 (*Gannon 2003*). Cette molécule est un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques qui agit également comme agoniste des auto-récepteurs 5-HT_{1A}. Chez le Hamster syrien, la courbe de réponse de phase pour cet agoniste comporte des déphasages uniquement en fin de nuit subjective et ne mime donc que partiellement les effets de la lumière. Ce sont ces propriétés pharmacologiques particulières qui provoquent ces effets qui apparaissent comme différents des effets de type photique observés chez le Rat.

Les récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT₃ sont donc les médiateurs de la synchronisation sérotonergique de type photique chez le Rat. Ce mimétisme particulier, opéré par le système sérotonergique dans les SCN, n'a quasiment pas été étudié chez les autres espèces nocturnes et diurnes. De plus, la localisation précise des récepteurs 5-HT₃ reste à être définie dans les SCN.

3. Modulation sérotonergique de la synchronisation photique

a. Modulation négative chez les rongeurs nocturnes

Dans l'introduction de cette thèse, nous avons explicité, qu'au-delà des effets directs de synchronisation de l'horloge circadienne principale, le système sérotonergique était capable de moduler négativement la synchronisation photique des SCN. Chez le Hamster syrien et la Souris, des injections systémiques et locales de 8-OH-DPAT et de fluoxétine inhibent les

déphasages de l'activité locomotrice, induits par des créneaux de lumière (Challet et al. 2001 ; Gannon et Millan 2007 ; Rea et al. 1994 ; Weber et al. 1998). Il a également été démontré chez le Hamster syrien que des injections de 8-OH-DPAT et de quipazine réduisent l'induction de FOS résultant d'un créneau lumineux (Glass et al. 1994 ; Rea et al. 1994 ; Selim et al. 1993). L'augmentation de l'activité électrique des SCN du Hamster syrien, produite par une stimulation lumineuse de la rétine, est également inhibée par des applications de 8-OH-DPAT, de 5-CT et de 5-HT (Ying et Rusak 1994 ; 1997).

De manière inattendue, les études menées sur la modulation sérotonergique de la synchronisation photique des SCN du Rat sont quasiment inexistantes. Une seule étude montre, chez cette espèce, que l'induction de l'expression de FOS en réponse à un créneau de lumière est inhibée par une injection de 8-OH-DPAT (Recio et al. 1996) , mais de manière moins importante comparée aux résultats obtenus chez le Hamster syrien (Glass et al. 1994 ; Rea et al. 1994). Devant ce manque de résultats, la troisième étude de cette thèse a justement étudié les effets modulateurs du système sérotonergique sur la synchronisation photique chez le Rat. Ainsi, nous avons déterminé que des injections de (+)8-OH-DPAT et de fluoxétine, réalisées en fin de nuit subjective, inhibent les avances de phase de l'activité locomotrice induites par un créneau de lumière (Cuesta et al. 2009b). Ce résultat, observé chez le Rat, est similaire à ceux obtenus chez le Hamster syrien et la Souris et place donc le système sérotonergique comme modulateur négatif de la synchronisation photique chez les rongeurs nocturnes.

De plus, notre étude a été la première à observer l'expression des gènes horloges en réponse à l'association d'une stimulation sérotonergique et d'un créneau lumineux. D'une part, nous avons confirmé qu'un créneau de lumière, appliqué en fin de nuit subjective, provoque une augmentation rapide de l'expression de *Per1* et une augmentation plus lente de celle de *Per2* (Zylka et al. 1998; Yan et Silver 2002). De plus, nous avons mis en évidence que la lumière induit également l'expression de *Rorb*, dont l'implication dans la synchronisation photique a déjà été soulignée (Masana et al. 2007). D'autre part, nous avons mis en évidence dans les SCN qu'en fin de nuit subjective, des injections de fluoxétine augmentent l'expression induite par la lumière de *Per1*, et dans une moindre mesure, de *Per2* et de *Rorb*. Ces résultats ne corroborent pas la théorie unificatrice établie pour expliquer la résultante moléculaire des interactions entre facteurs photique et non-photiques (Maywood et Mrosovsky 2001). Cette théorie postule que les facteurs non-photiques inhibent l'induction de l'expression des gènes *Per* en réponse à la lumière. Cette explication, bien que valable pour certains facteurs non-photiques (Brewer et al. 2002 ; Ehlen et al. 2008 ; Yokota et al. 2000), ne l'est pas pour

d'autres (Christian et Harrington 2002 ; Cuesta et al. 2009b ; Edelstein et al. 2003). Il semble donc que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction des facteurs photique et non-photiques sont hautement complexes et ne sont pas limités à des modifications de l'expression des gènes horloges dans les SCN. Des modifications aux niveaux traductionnel, post-traductionnel et sur d'autres acteurs que les gènes horloges sont donc envisageables.

Ces résultats mettent pour la première fois en avant la capacité du système sérotonergique à moduler la synchronisation photique des SCN du Rat, de manière similaire à celle observée chez les autres rongeurs nocturnes.

b. Modulation positive chez les rongeurs diurnes

Les interactions entre facteurs photique et non-photiques ont été très peu étudiées chez les rongeurs diurnes. À ce jour, il n'existe que peu de travaux ayant étudié les effets d'injections d'agonistes des récepteurs GABA_A (muscimol) et GABA_B (baclofen) sur la synchronisation photique des SCN d'un rongeur diurne, le Rat du Nil (Ehlen et al. 2008 ; Novak et al. 2004 ; 2006 ; Novak et Albers 2004b). Ces injections inhibent les déphasages de l'activité locomotrice, induits par la lumière pendant la nuit subjective. Ces effets sont donc similaires à ceux observés chez un rongeur nocturne, le Hamster syrien (Gillespie et al. 1996 ; 1997). Cela signifierait que ce facteur non-photique (et peut-être les autres facteurs non-photiques) agirait de la même manière sur la synchronisation photique des SCN, chez les rongeurs nocturnes et diurnes.

D'un point de vue moléculaire, par contre, les effets du muscimol diffèrent quelque peu entre espèces nocturnes et diurnes. Chez le Rat du Nil, les injections d'agonistes GABA_A, réalisées en début de nuit subjective, inhibent l'expression de *Per2* dans les SCN, mais pas celle de *Per1* (Novak et al. 2006). Chez le Hamster syrien, l'induction de l'expression de *Per1* a lieu durant toute la nuit subjective, alors que celle de *Per2* prend place en fin de nuit subjective (Ehlen et al. 2008). La disparité des données obtenues souligne plutôt la complexité des effets induits par une stimulation concomitante de la lumière et d'un facteur non-photique sur les SCN que de différences permettant de mieux comprendre diurnalité et nocturnalité.

La première étude de cette thèse a permis d'observer les effets d'un autre facteur non-photique sur la synchronisation photique. Des injections de (+)8-OH-DPAT et de fluoxétine potentialisent à la fois les retards et les avances de phase de l'activité locomotrice, induits par des créneaux lumineux pendant la nuit subjective (Cuesta et al. 2008). Cette modulation est

donc opposée à celle obtenue chez le Hamster syrien et la Souris avec les même molécules (Challet *et al.* 2001 ; Gannon *et Millan* 2007 ; Rea *et al.* 1994 ; Weber *et al.* 1998). Elle est également opposée aux résultats trouvés chez une autre espèce diurne, mais pour un autre facteur non-photique : une activation GABAergique (Novak *et al.* 2004 ; 2006 ; Novak *et Albers* 2004b). Ces données comportementales mettent donc en évidence plusieurs différences supplémentaires entre espèces diurnes et nocturnes. Premièrement, la modulation sérotonergique de la synchronisation photique est totalement opposée entre rongeurs diurnes et nocturnes. Ce résultat est donc en accord avec le fait que la synchronisation non-photique, médiée par la sérotonine, l'est également. Deuxièmement, il semble que la synchronisation non-photique de type GABAergique, bien qu'ayant les mêmes effets que celle de type sérotonergique chez les espèces nocturnes, véhiculent des informations différentes, puisque que ces deux types de synchronisation n'ont pas les même conséquences chez les espèces diurnes. En effet, en plus des effets différentiels qui viennent d'être exposés concernant la modulation de la synchronisation photique, les effets non-photiques du GABA et de la 5-HT diffèrent également chez les espèces diurnes. L'activation des récepteurs GABA_A aboutit à des retards de phase en milieu de jour subjectif (Novak *et Albers* 2004a), alors que l'activation des récepteurs 5-HT_{1A/7} provoque des avances de phase pendant la nuit subjective (Cuesta *et al.* 2008). Il est possible que ces différences aient un impact sur les mécanismes sous-tendant diurnalité et nocturnité. De plus, tous ces résultats renforcent l'idée qu'il existe des facteurs non-photiques dépendant du cycle veille-sommeil (5-HT), alors que d'autres sont indépendants de ce cycle (GABA).

Dans la première étude de cette thèse, nous avons également cherché à étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation sérotonergique de la synchronisation photique chez l'Arvicanthis soudanais (Cuesta *et al.* 2008). En tout début de nuit subjective, les injections de fluoxétine et de (+)8-OH-DPAT, doublées de créneaux lumineux, induisent une augmentation de l'expression de *Per2* et de *Rev-erba* dans les SCN, alors que la lumière, appliquée seule, est sans effet à ce moment-là. En toute fin de nuit subjective, ces injections potentialisent et inhibent respectivement l'induction par la lumière de l'expression de *Per1* et de *Rorb* dans les SCN. Ces résultats indiquent que les interactions des facteurs photique et non-photiques provoquent des réponses complexes au niveau transcriptionnel. Quand on compare ces résultats à ceux trouvés chez le Rat suite à des injections de fluoxétine réalisées en fin de nuit subjective (Cuesta *et al.* 2009b), on observe d'une part des effets similaires sur l'expression de *Per1* et d'autre part des effets opposés sur l'expression de *Rorb*. Ces résultats sont difficiles à interpréter, mais il semble que *Rorb* ait un rôle particulier. En effet, suite à

une stimulation lumineuse, l'expression de ce gène est augmentée de manière similaire chez les espèces diurnes et nocturnes. Par contre, l'induction de cette expression est inhibée en réponse à une stimulation sérotonergique chez les espèces diurnes (*Cuesta et al. 2008*), alors qu'elle est potentialisée chez les espèces nocturnes (*Cuesta et al. 2009b*). Une fois encore, l'ensemble de ces résultats est à considérer avec prudence, du fait des possibles modifications aux niveaux traductionnel et post-traductionnel en réponse à l'interaction des facteurs photique et non-photiques.

Comme au niveau comportemental, les effets moléculaires de l'activation des récepteurs GABA_A (*Ehlen et al. 2008 ; Novak et al 2006*) sont différents de ceux trouvés après une activation des récepteurs 5-HT_{1A/7} (*Cuesta et al. 2009*). Alors qu'en début de nuit subjective, dans les SCN, le GABA a un effet inhibiteur sur l'induction de l'expression de *Per2* en réponse à la lumière, le système sérotonergique potentialise la synthèse d'ARNm de *Per2*. Cela renforce encore l'idée que ces deux facteurs non-photiques n'ont pas le même rôle dans les SCN, du moins chez les espèces diurnes.

Ces résultats démontrent clairement que la modulation sérotonergique de la synchronisation photique diffère grandement entre espèces diurnes et nocturnes et place une fois encore le système sérotonergique comme un facteur important dans les mécanismes régulant diurnalité et nocturnalité.

c. Modulation positive chez les rongeurs nocturnes

Nous avons déjà énoncé l'une des propriétés particulières du système sérotonergique du Rat qui, rappelons-le, est capable de mimer les effets de la synchronisation photique (*Cuesta et al. 2009b ; Graff et al. 2005 ; 2007 ; Kalkowski et Wollnik, 1999 ; Kennaway et al. 1996 ; Kennaway et Moyer 1998 ; Kohler et al. 1999 ; Varcoe et al., 2003 ; Varcoe et Kennaway 2008*). Le système sérotonergique possède également une autre particularité, décrite pour la première fois dans la troisième étude de cette thèse (*Cuesta et al. 2009b*). En fin de nuit subjective, une activation des récepteurs 5-HT_{2C} est capable de potentialiser les avances de phase de l'activité locomotrice, induites par la lumière. Cet effet n'est, par contre, pas observé par des traitements couplant une activation des récepteurs 5-HT₃ avec un créneau de lumière. L'absence de potentialisation, suite à une activation des récepteurs 5-HT₃, est peut-être due à la possible localisation présynaptique de ce récepteur sur les terminaisons du RHT (*Graff et al. 2005*). En effet, pour mimer les effets de la lumière, ce récepteur permet la libération de glutamate par le RHT. Or, si la lumière a déjà déclenché une libération massive de glutamate,

la libération supplémentaire provoquée par l'activation concomitante des récepteurs 5-HT₃ serait négligeable et n'entraînerait pas d'augmentation des avances de phase induites par la lumière. Par contre, les récepteurs 5-HT_{2C} sont, eux, situés au niveau postsynaptique dans les SCN (*Varcoe et Kennaway 2008*) et leur activation et donc les voies intracellulaires qu'ils stimulent, seraient indépendantes de la libération de glutamate, ce qui permettrait la potentialisation des avances de phase de l'activité locomotrice.

Chez le Hamster syrien, l'activation des récepteurs 5-HT_{2C} ne modifie pas les effets de déphasages de l'activité locomotrice, induits par la lumière en fin de nuit subjective (*Gannon et Millan 2006*). Cela confirme l'hypothèse que la modulation sérotonergique positive de la synchronisation photique est une caractéristique propre au Rat, due à la présence des récepteurs 5-HT_{2C} dans les SCN. Il est toutefois possible chez le Hamster syrien de potentialiser les déphasages induits par la lumière *via* des injections de molécules aux effets mixtes (agonistes des auto-récepteurs 5-HT_{1A} et antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques ; *Byku et Gannon 2000 ; Gannon 2003 ; Gannon et Millan 2006 ; Matsuda et al. 1995 ; Rea et al. 1995 ; Sterniczuk et al. 2008 ; Takahashi et al. 2002*). Cependant, ces effets sont uniquement dûs aux propriétés pharmacologiques de ces composés et la réalité physiologique d'un tel processus reste à démontrer.

Le système sérotonergique du Rat est capable, à la fois, d'inhiber et de potentialiser les effets de déphasages de l'activité locomotrice, conférant donc à ce système une action opposée au sein de l'horloge circadienne principale. Cependant, le rôle physiologique de cette double modulation est inconnu pour le moment.

d. Récepteurs impliqués dans la modulation sérotonergique de la synchronisation photique

Chez les espèces nocturnes et diurnes, les agonistes principaux responsables de la modulation de la synchronisation photique des SCN sont le 8-OH-DPAT et le (+)8-OH-DPAT, qui se lient aux récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ (*Cuesta et al. 2008 ; 2009b ; Rea et al. 1994 ; Weber et al. 1998*). La situation est similaire à la synchronisation non-photique des SCN précédemment décrite, car ces deux récepteurs semblent potentiellement impliqués dans ces effets. En effet, l'application de 8-OH-DPAT inhibe l'induction de l'activité électrique des SCN du Hamster syrien, suite à une stimulation lumineuse (*Ying et Rusak 1994 ; 1997*). Cette inhibition est plus ou moins réduite par l'application d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (*Ying et Rusak 1994*) et très fortement réduite par l'application d'antagonistes des récepteurs 5-HT₇ (*Ying et*

Rusak 1997). De plus, la libération de glutamate par le RHT en réponse à une stimulation du nerf optique, serait faiblement réduite par l'activation des récepteurs 5-HT₇ (Smith et al. 2001). L'étude des Souris mutantes apporte également des preuves indirectes de l'implication de ces récepteurs dans les mécanismes de synchronisation photique des SCN. Les Souris mutantes pour le récepteur 5-HT₇ présentent des retards de phase de l'activité locomotrice après un créneau de lumière, appliqué en fin de nuit subjective, alors qu'on observe des avances de phase chez les Souris sauvages (Gardani et Biello 2008). Chez les Souris mutantes pour le récepteur 5-HT_{1A}, les avances de phase induites par la lumière sont plus grandes que celles obtenues chez les Souris sauvages (Smith et al. 2008). La troisième étude de cette thèse a également tenté d'élucider l'implication de ces deux récepteurs, par l'utilisation d'un agoniste spécifique des récepteur 5-HT₇ récemment développé et encore très peu utilisé, l'AS19 (Perez-Garcia et Meneses 2006; Meneses et al. 2008). L'injection de cet agoniste chez le Rat ne diminue pas les avances de phase de l'activité locomotrice, induites par la lumière en fin de nuit subjective, alors que c'est le cas pour le (+)8-OH-DPAT (Cuesta et al. 2009b). Ce résultat suggère que ce sont les récepteurs 5-HT_{1A} qui seraient responsables des effets de modulation de la synchronisation photique, mais au vu de tous les résultats, il serait plus prudent de postuler que l'activation de ces deux récepteurs est nécessaire pour assurer les effets modulateurs du système sérotonergique dans les SCN.

Encore une fois, l'implication des autres structures participant à la synchronisation des SCN (IGL, NRD et NRM) et des récepteurs qu'elles expriment n'est pas à exclure. Cependant, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ situés dans les SCN semblent être les acteurs prédominants de cette modulation, puisque des injections locales dans les SCN de 8-OH-DPAT sont capables d'inhiber les déphasages de l'activité locomotrice induits par la lumière (Weber et al. 1998).

Les récepteurs 5-HT_{1B} participent également à la modulation de la synchronisation photique de l'horloge circadienne principale. Apparemment, l'activation de ces récepteurs inhiberait les déphasages de l'activité locomotrice et de l'activité électrique des SCN, induits par la lumière ou par une stimulation du nerf optique (Pickard et al. 1996 ; 1999; Pickard et Rea 1997 ; Smith et al. 2001 ; Srkalovic et al. 1994). L'activation des récepteurs 5-HT_{1B} aboutirait à une réduction de la libération de glutamate par le RHT, normalement induite par la lumière chez le Hamster syrien et la Souris.

Il y a donc au moins trois sous-types de récepteurs 5-HT (5-HT_{1A}, 5-HT₇ et 5-HT_{1B}) qui participent à la modulation négative de la synchronisation photique des SCN, chez les espèces nocturnes et probablement chez les espèces diurnes. De plus, chez le Rat, un

quatrième sous-type de récepteurs 5-HT (5-HT_{2C}) est responsable d'une modulation positive particulière de la synchronisation photique des SCN.

Tous ces résultats, ainsi que ceux obtenus dans le cadre de la synchronisation non-photique et de type photique, démontrent à quel point le système sérotonergique joue un rôle crucial dans les mécanismes régulant le fonctionnement de l'horloge circadienne principale et dans ceux sous-tendant diurnalité et nocturnalité *via* la multitude de sous-types de récepteurs présents dans les SCN (Figures 18 et 19).

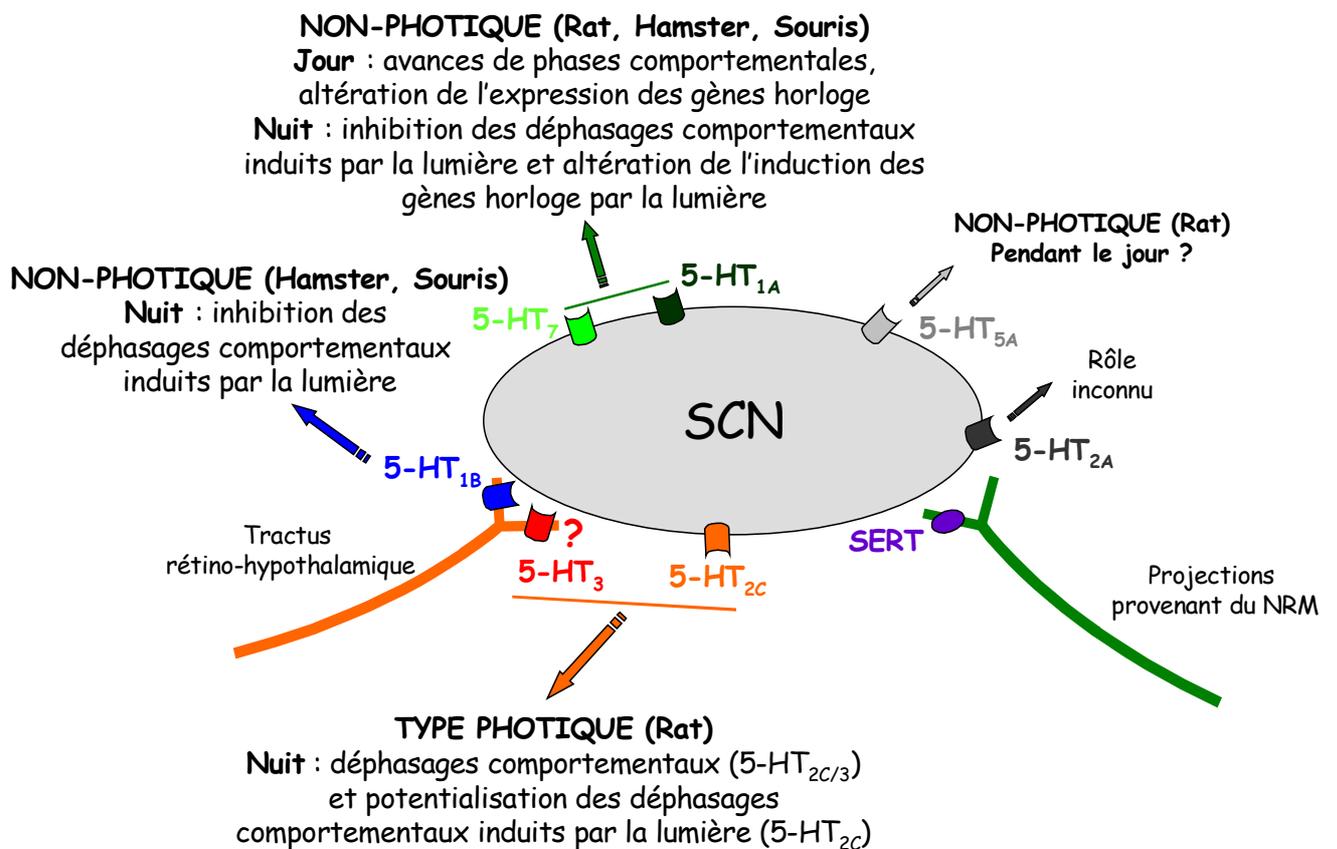


Figure 18 : Schéma récapitulatif simplifié des effets de l'activation des récepteurs 5-HT présents dans les SCN, chez les rongeurs nocturnes.

? : Localisation non déterminée ; NRM : noyau du raphé médian ; SCN : noyau supra-chiasmatique ; SERT : transporteur spécifique de recapture de 5-HT.

NON-PHOTIQUE (Arvicanthis soudanais)
Nuit : avances de phases comportementales,
pas d'altération de l'expression des gènes horloge
Nuit : potentialisation des déphasages
comportementaux induits par la lumière et altération
de l'induction des gènes horloge par la lumière

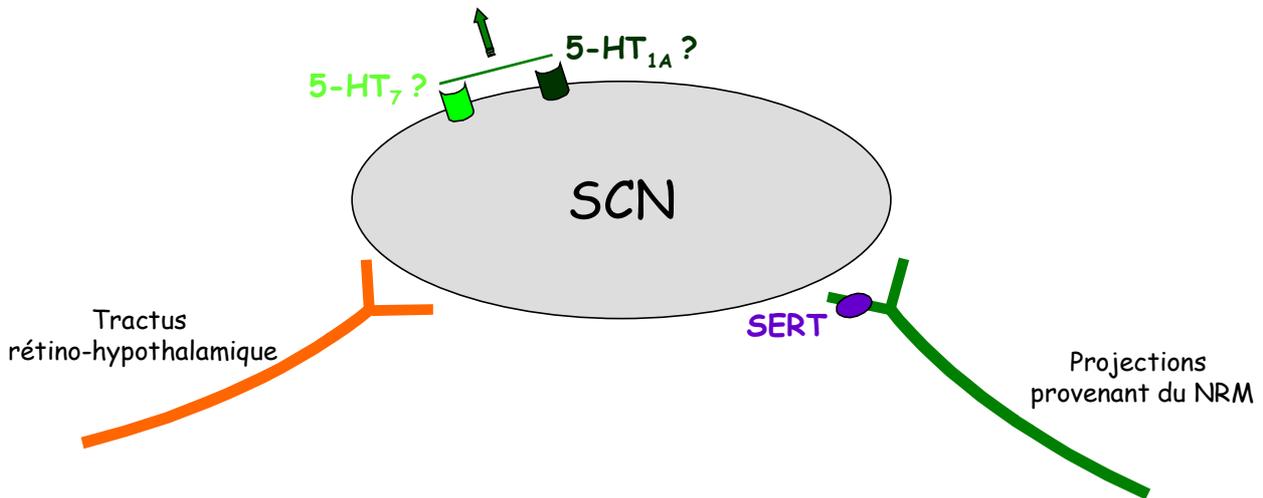


Figure 19 : Schéma hypothétique des effets de l'activation des récepteurs 5-HT présents dans les SCN, chez les rongeurs diurnes.

? : Localisation non déterminée ; NRM : noyau du raphé médian ; SCN : noyau suprachiasmatique ; SERT : transporteur spécifique de recapture de 5-HT.

4. Modèle diurne, système sérotonergique, horloge circadienne principale et possibles applications thérapeutiques

Des altérations des rythmes circadiens sont souvent associées aux troubles de l'humeur, comme la dépression (*Rosenwasser et Wirz-Justice 1997 ; Lader 2007*). Cependant, on ne sait pas à l'heure actuelle, si ce sont les altérations au niveau de l'horloge circadienne principale qui provoquent la dépression ou l'inverse. Ces perturbations sont en tout cas liées et de nombreuses preuves expérimentales montrent que certains antidépresseurs ont des effets sur les SCN, suite à une administration aiguë ou chronique. La fluoxétine fait partie de ces composés fréquemment utilisés dans le traitement de la dépression (*Wong et al. 2005*). Chez les espèces nocturnes, nous avons déjà décrit que les injections uniques de fluoxétine agissent sur l'horloge suprachiasmatique de manière directe (effets non-photiques) et par une interaction avec la synchronisation photique, ayant dans les deux cas, des conséquences aux niveaux moléculaire et comportemental (*Cuesta et al. 2009b ; Challet et al. 2001 ; Gannon et*

Millan 2007). Les études, portant sur les effets circadiens d'une administration chronique de fluoxétine chez les rongeurs nocturnes, sont plus rares. Certains travaux montrent que des traitements chroniques à la fluoxétine sont sans effet sur le rythme d'activité locomotrice de Rat placés en DD (Wollnik 1992). Chez la Souris, des injections chroniques de fluoxétine raccourcissent la période endogène (Possidente et al. 1992). Une étude a également montré que des applications chroniques de fluoxétine provoquent une diminution de l'expression des récepteurs 5-HT₇ et que ces récepteurs seraient la cible principale des antidépresseurs dans les SCN (Mullins et al. 1999).

Chez les rongeurs diurnes, la première étude de cette thèse est la seule à avoir mis en évidence, à ce jour, des effets chronobiotiques aigus de la fluoxétine sur les SCN, qui sont de surcroît opposés à ceux obtenus chez les espèces nocturnes (Cuesta et al. 2008). Ce résultat différentiel met en avant l'importance d'étudier des modèles diurnes dont l'organisation temporelle est plus proche de celle de l'Homme, afin de développer des outils thérapeutiques plus adaptés à la physiologie des animaux diurnes. Le fait que chez l'Arvicanthis soudanais, le système sérotonergique *via* des injections de fluoxétine, soit capable de potentialiser les déphasages induits par la lumière, suggère que l'action anti-dépressive de la fluoxétine, administrée de manière chronique chez l'Homme, pourrait passer en partie par une action chronobiotique sur les SCN *via* une augmentation de la sensibilité au facteur photique par exemple.

Étant donnée la diversité des sous-types de récepteurs 5-HT présents dans les SCN et ayant des fonctions diverses, la fluoxétine qui provoque une augmentation de la libération de 5-HT agissant sur tous les récepteurs, ne serait pas forcément l'outil thérapeutique le plus adapté pour une action anti-dépressive médiée par les SCN.

Le développement de composés plus spécifiques pour l'un ou l'autre sous-type de récepteurs, présents dans l'horloge suprachiasmatique, pourrait augmenter l'efficacité thérapeutique grâce à une action plus ciblée que celle médiée par la fluoxétine. C'est par exemple le cas de l'agomélatine, un composé qui est à la fois un agoniste des récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine et un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C}. L'agomélatine permettrait de traiter les troubles de l'humeur, dont la dépression (Eser et al. 2007 ; Racagni et al. 2007 ; San et Arranz 2008 ; Stein et al. 2008) *via* notamment à son action sur les récepteurs 5-HT_{2C}. Ce composé illustre donc l'intérêt de mieux comprendre la modulation sérotonergique de l'horloge circadienne principale, ce qui permettra une meilleure approche thérapeutique.

CHAPITRE 5 - PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse ont permis de définir que l'Arvicanthis soudanais représente un modèle ayant une physiologie diurne. L'étude de ce modèle, au niveau circadien, a permis de mettre en avant que la modulation sérotonergique de l'horloge circadienne principale agit de manière différente entre rongeurs diurnes et nocturnes, sans toutefois pouvoir affirmer que cette modulation différentielle est à l'origine de la diurnalité ou de la nocturnité.

Néanmoins, il est un peu hasardeux de généraliser à la diurnalité les données obtenues à partir d'une seule espèce diurne. Une des priorités fondamentales sera donc d'étudier d'autres espèces diurnes, comme la Gerbille mongole et le Degu du Chili, ainsi que des espèces dont la diurnalité a été caractérisée récemment, comme la Souris des champs à quatre rayures et la Souris rayée africaine. L'obtention de résultats similaires à ceux observés chez l'Arvicanthis soudanais, concernant par exemple l'action du système sérotonergique sur les SCN, permettra de conclure quant à des effets propres à la diurnalité, qui pourraient donc être également retrouvés chez l'Homme.

Une autre perspective importante, faisant suite à cette thèse, sera de caractériser le système sérotonergique en relation avec l'horloge circadienne principale, chez l'Arvicanthis soudanais (et chez d'autres rongeurs diurnes). En effet, bien que nous ayons démontré l'effet des agonistes sérotonergiques sur les SCN, nous ne savons pas si les afférences, provenant du NRD et du NRM, innervent les SCN et les IGL de manière identique à ce qui a été observé chez les rongeurs nocturnes. Il est donc nécessaire *via* des techniques d'immunomarquages (anticorps 5-HT et SERT) et de traçage, de caractériser les voies émanant de ces différentes structures. De plus, il semble également indispensable de localiser par immunomarquages et/ou par autoradiographie les différents sous-types de récepteurs 5-HT présents dans ces différentes structures chez l'Arvicanthis soudanais. Il est également nécessaire de mettre en évidence la présence des récepteurs 5-HT₃ dans les SCN du Rat (et peut-être des autres espèces nocturnes et diurnes), puisqu'ils n'ont toujours pas été précisément localisés à ce jour. Ceci ouvre une autre perspective, valable autant chez les rongeurs diurnes que nocturnes : il est indispensable de déterminer la localisation sub-cellulaire des récepteurs 5-HT dans les SCN, par le biais de double marquage pour le sous-type de récepteur (ex : 5-HT_{1A}, 5-HT₇, 5-HT₃) et le type de neurone (ex : GABA, glutamate), ainsi que par des techniques d'immunohistochimie couplée à la microscopie électronique. Ceci permettra à la fois, de caractériser la localisation pré- ou postsynaptique des récepteurs, ainsi que le type cellulaire (neurones ou cellules gliales) où ils sont exprimés, ce qui fournira des explications quant aux relations entre la localisation et le rôle des récepteurs 5-HT présents dans les SCN.

L'étude de l'implication respective des structures (SCN, IGL, NRD et NRM), en relation avec la synchronisation de l'horloge circadienne principale, devra également être menée chez l'Arvicanthis soudanais, par le biais d'injections locales de NPY dans les SCN (médiateur des informations provenant des IGL) et d'agonistes sérotonergiques dans les SCN, les IGL, le NRD et le NRM. Les résultats trouvés permettront d'une part, de connaître le rôle respectif de chacune de ces structures dans les phénomènes de synchronisation chez un animal diurne et d'autre part, de savoir si le fonctionnement de ces structures est similaire ou non à celui observé chez les espèces nocturnes.

Le système sérotonergique du Rat est capable de mimer les effets de la lumière sur l'horloge suprachiasmatique. Cette spécificité n'a quasiment jamais été étudiée chez les autres rongeurs nocturnes. Il semble indispensable de confirmer *via* des études pharmacologiques et comportementales, si cette particularité est propre au Rat ou si elle est retrouvée chez les autres espèces nocturnes et également chez les espèces diurnes, comme l'Arvicanthis soudanais. Si ce type de modulation était observée chez toutes les espèces, il sera alors nécessaire de développer des outils thérapeutiques plus ciblés dans le traitement de certaines neuropathologies comme la dépression. En effet, à l'heure actuelle, les traitements utilisés ne sont pas spécifiques d'un sous-type de récepteur 5-HT mais agissent sur l'ensemble du système sérotonergique. Puisqu'il semble qu'une part des effets curatifs pourrait être médiée par une action sur l'horloge circadienne principale et que les différents récepteurs présents dans cette structure ont des rôles qui leur sont propres et parfois opposés (dans le cas de la modulation de type photique en particulier), le développement de composés spécifiques pour un seul sous-type de récepteur pourrait avoir de meilleurs effets thérapeutiques avec éventuellement une action concomitante sur d'autres système neurochimiques, comme c'est le cas pour l'agomélatine (stratégie multi-cibles).

Enfin, il faudra continuer à explorer le fonctionnement de l'horloge circadienne principale et des structures connectées avec cette dernière *via* notamment des études lésionnelles, afin de discriminer les acteurs participant au maintien ou à l'établissement de la diurnalité ou de la nocturnité. En effet, il est plus que probable que l'établissement de ces deux caractères soit dû à l'association de nombreuses structures cérébrales (rétine, SCN, IGL, NRD, NRM, VLPO...) sous forme d'un réseau fonctionnant de manière différente entre espèces nocturnes et diurnes et dont les boucles de rétroaction participent au maintien de l'un ou l'autre de ces caractères. Dans ce cadre, cette thèse aura permis de placer la sérotonine et les structures libérant cette molécule au cœur de ce réseau.

CHAPITRE 6 - BIBLIOGRAPHIE

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 H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M, Yu W, Honma K (1999) Phase-dependent induction by light of rat *Clock* gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 66:104-110.
- Aghajanian GK, Marek GJ (1999) Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology* 21:16S-23S.
- Aghajanian GK, Vandermaelen CP (1982) Intracellular recordings from serotonergic dorsal raphe neurons: pacemaker potentials and the effect of LSD. *Brain Res* 238:463-469.
- Akashi M, Takumi T (2005) The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat Struct Mol Biol* 12:441-448.
- Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, Maetani M, Watanabe S, Tei H, Sakaki Y, Shibata S (1999) Inhibition of light- or glutamate-induced *mPer1* expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci* 19:1115-1121.
- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91:1055-1064.
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC (2001) *MPer1* and *mper2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* 16:100-104.
- Albus H, Bonnefont X, Chaves I, Yasui A, Doczy J, van der Horst GT, Meijer JH (2002) Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol* 12:1130-1133.
- Andre E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton SC, Porciatti V, Becker-Andre M (1998) Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J* 17:3867-3877.
- Ankel-Simons F, Rasmussen DT (2008) Diurnality, nocturnality, and the evolution of primate visual systems. *Am J Phys Anthropol Suppl* 47:100-117.
- Antle MC, Mistlberger RE (2000) Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster. *J Neurosci* 20:9326-9332.
- Antle MC, Ogilvie MD, Pickard GE, Mistlberger RE (2003) Response of the mouse circadian system to serotonin 1A/2/7 agonists in vivo: surprisingly little. *J Biol Rhythms* 18:145-158.
- Armstrong SM, Cassone VM, Chesworth MJ, Redman JR, Short RV (1986) Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm Suppl* 21:375-394.
- Aschoff J, Daan S, Honma KI (1982) *Zeitgebers, entrainment, and masking: some unsettled questions* (Aschoff J, Daan S et al., eds), Ed 1, pp 13-24. Berlin: Springer-Verlag.
- Azmitia E, Gannon P (1983) The ultrastructural localization of serotonin immunoreactivity in myelinated and unmyelinated axons within the medial forebrain bundle of rat and monkey. *J Neurosci* 3:2083-2090.

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

B.

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, Lee C, Hardin PE, Edery I (2000) dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PER-TIM complex. *J Neurosci* 20:1746-1753.

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

Barnard AR, Appleford JM, Sekaran S, Chinthapalli K, Jenkins A, Seeliger M, Biel M, Humphries P, Douglas RH, Wenzel A, Foster RG, Hankins MW, Lucas RJ (2004) Residual photosensitivity in mice lacking both rod opsin and cone photoreceptor cyclic nucleotide gated channel 3 alpha subunit. *Vis Neurosci* 21:675-683.

Belenky M, Wagner S, Yarom Y, Matzner H, Cohen S, Castel M (1996) The suprachiasmatic nucleus in stationary organotypic culture. *Neuroscience* 70:127-143.

Belenky MA, Pickard GE (2001) Subcellular distribution of 5-HT(1B) and 5-HT(7) receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 432:371-388.

Bender E, Pindon A, van Oers I, Zhang YB, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Luyten W (2000) Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J Neurochem* 74:478-489.

Biello SM, Golombek DA, Harrington ME (1997a) Neuropeptide Y and glutamate block each other's phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience* 77:1049-1057.

Biello SM, Golombek DA, Schak KM, Harrington ME (1997b) Circadian phase shifts to neuropeptide Y In vitro: cellular communication and signal transduction. *J Neurosci* 17:8468-8475.

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

Biello SM, Mrosovsky N (1995) Blocking the phase-shifting effect of neuropeptide Y with light. *Proc Biol Sci* 259:179-187.

Biggs KR, Prosser RA (1999) Neuropeptide Y blocks GABAB-induced phase-shifts of the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res* 821:461-466.

Bina KG, Rusak B, Semba K (1993) Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurol* 335:295-307.

Blanchong JA, McElhinny TL, Mahoney MM, Smale L (1999) Nocturnal and diurnal rhythms in the unstriped Nile rat, *Arvicanthis niloticus*. *J Biol Rhythms* 14:364-377.

Blanchong JA, Smale L (2000) Temporal patterns of activity of the unstriped Nile Rat, *Arvicanthis niloticus*. *J Mammal* 81:595-599.

Bobrzynska KJ, Godfrey MH, Mrosovsky N (1996) Serotonergic stimulation

- and nonphotic phase-shifting in hamsters. *Physiol Behav* 59:221-230.
- Bobu C, Craft CM, Masson-Pevet M, Hicks D (2006) Photoreceptor organization and rhythmic phagocytosis in the Nile rat *Arvicanthis ansorgei*: a novel diurnal rodent model for the study of cone pathophysiology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3109-3118.
- Bobu C, Lahmam M, Vuillez P, Ouarour A, Hicks D (2008) Photoreceptor organization and phenotypic characterization in retinas of two diurnal rodent species: potential use as experimental animal models for human vision research. *Vision Res* 48:424-432.
- Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P (2006) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res* 326:553-572.
- Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Jr., Krueger JM (2004) Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1071-1079.
- Boess FG, Beroukhim R, Martin IL (1995) Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J Neurochem* 64:1401-1405.
- Boess FG, Martin IL (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33:275-317.
- Bolli GB, De Feo P, De Cosmo S, Perriello G, Ventura MM, Calcinaro F, Lolli C, Campbell P, Brunetti P, Gerich JE (1984) Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes* 33:1150-1153.
- Bonaventure P, Nepomuceno D, Kwok A, Chai W, Langlois X, Hen R, Stark K, Carruthers N, Lovenberg TW (2002) Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT(1A) knockout and 5-HT(1A/1B) double-knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 302:240-248.
- Boulos Z, Rosenwasser AM, Terman M (1980) Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res* 1:39-65.
- Boulos Z, Rusak B (1982) Circadian phase response curves for dark pulses in the hamster. *J Comp Physiol A* 146:411-417.
- Bramley JR, Sollars PJ, Pickard GE, Dudek FE (2005) 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of GABA release in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 93:3157-3164.
- Brewer JM, Yannielli PC, Harrington ME (2002) Neuropeptide Y differentially suppresses *per1* and *per2* mRNA induced by light in the suprachiasmatic nuclei of the golden hamster. *J Biol Rhythms* 17:28-39.
- Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2:521-526.
- 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.
- Buxton OM, Frank SA, L'Hermite-Baleriaux M, Leproult R, Turek FW, Van Cauter E (1997) Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. *Am J Physiol* 273:E536-542.

- Buxton OM, Lee CW, L'Hermite-Baleriaux M, Turek FW, Van Cauter E (2003) Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R714-724.
- Byku M, Gannon RL (2000) Effects of the 5HT1A agonist/antagonist BMY 7378 on light-induced phase advances in hamster circadian activity rhythms during aging. *J Biol Rhythms* 15:300-305.

C.

- Cailotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M, Pevet 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.
- Caldelas I, Challet E, Saboureau M, Pevet P (2005) Light and melatonin inhibit in vivo serotonergic phase advances without altering serotonergic-induced decrease of per expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Mol Neurosci* 25:53-63.
- Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pevet P, Challet E (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 116:583-591.
- Canal MM, Piggins HD (2006) Resetting of the hamster circadian system by dark pulses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R785-R792.
- Cassel JC, Jeltsch H (1995) Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications. *Neuroscience* 69:1-41.
- 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.
- Cermakian N, Sassone-Corsi P (2002) Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opin Neurobiol* 12:359-365.
- Challet E, le Maho Y, Robin JP, Malan A, Cherel Y (1995) Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 50:405-412.
- Challet E, Malan A, Pevet P (1996) Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neurosci Lett* 211:1-4.
- Challet E, Malan A, Turek FW, Van Reeth O (2004) Daily variations of blood glucose, acid-base state and PCO₂ in rats: effect of light exposure. *Neurosci Lett* 355:131-135.
- Challet E, Pevet P (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci* 8:s246-257.
- Challet E, Pevet P, Vivien-Roels B, Malan A (1997) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12:65-79.
- Challet E, Pitrosky B, Sicard B, Malan A, Pevet P (2002) Circadian organization in a diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910: chronotypes, responses to constant lighting conditions, and photoperiodic changes. *J Biol Rhythms* 17:52-64.
- Challet E, Scarbrough K, Penev PD, Turek FW (1998) Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating

- the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J Biol Rhythms* 13:410-421.
- Challet E, Turek FW, Laute M, Van Reeth O (2001) Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: role of serotonergic and metabolic signals. *Brain Res* 909:81-91.
- Chalmers DT, Watson SJ (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res* 561:51-60.
- Chang DC (2006) Neural circuits underlying circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Processes* 71:211-225.
- 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.
- Christian CA, Harrington ME (2002) Three days of novel wheel access diminishes light-induced phase delays in vivo with no effect on *per1* induction by light. *Chronobiol Int* 19:671-682.
- Clemett DA, Kendall DA, Cockett MI, Marsden CA, Fone KC (1999) Pindolol-insensitive [³H]-5-hydroxytryptamine binding in the rat hypothalamus; identity with 5-hydroxytryptamine₇ receptors. *Br J Pharmacol* 127:236-242.
- Coleman MA, Garland T, Jr., Marler CA, Newton SS, Swallow JG, Carter PA (1998) Glucocorticoid response to forced exercise in laboratory house mice (*Mus domesticus*). *Physiol Behav* 63:279-285.
- Conn CA, Borer KT, Kluger MJ (1990) Body temperature rhythm and response to pyrogen in exercising and sedentary hamsters. *Med Sci Sports Exerc* 22:636-642.
- Coogan AN, Piggins HD (2005) Dark pulse suppression of P-ERK and c-Fos in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 22:158-168.
- 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.
- Cuesta M, Clesse D, Pevet P, Challet E (2009a) From daily behavior to hormonal and neurotransmitters rhythms: Comparison between diurnal and nocturnal rat species. *Horm Behav*. In press.
- Cuesta M, Clesse D, Pevet P, Challet E (2009b) New light on the serotonergic rat paradox in the rat circadian system. Submitted
- Cuesta M, Mendoza J, Clesse D, Pevet P, Challet E (2008) Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. *Exp Neurol* 210:501-513.
- Cutrera RA, Ouarour A, Pevet P (1994) Effects of the 5-HT_{1a} receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photoc stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neurosci Lett* 172:27-30.
- Cutrera RA, Saboureaux M, Pevet P (1996) Phase-shifting effect of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor agonist, on locomotor activity in golden hamster in constant darkness. *Neurosci Lett* 210:1-4.

D.

- Daan S, Aschoff J (2001) The entrainment of circadian systems in handbook of behavioural neurobiology. In: 12 circadian clocks (Takahashi JS, Turek FW, Moore Ry; eds). New York: Kluwer academic, plenum publishers.
- Daan S, Pittendrigh SC (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J Comp Physiol* 106:253-266.
- Dardente H, Cermakian N (2007) Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int* 24:195-213.
- Dardente H, Menet JS, Challet E, Tournier BB, Pevet P, Masson-Pevet M (2004) Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res* 124:143-151.
- Dardente H, Poirel VJ, Klosen P, Pevet P, Masson-Pevet M (2002) Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res* 958:261-271.
- Daszuta A, Barrit MC (1982) Endogenous serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) levels in large regions and in discrete brain areas of C57BL and BALBc mice at three times of the day. *Brain Res Bull* 8:477-482.
- De Boer SF, Van der Gugten J (1987) Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. *Physiol Behav* 40:323-328.
- De Deurwaerdere P, Stinus L, Spampinato U (1998) Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors. *J Neurosci* 18:6528-6538.
- De la Iglesia HO, Meyer J, Carpino A Jr, Schwartz WJ (2000) Antiphase of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* 290:799-901.
- De Vivo M, Maayani S (1986) Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1a} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 238:248-253.
- Ding JM, Buchanan GF, Tischkau SA, Chen D, Kuriashkina L, Faiman LE, Alster JM, McPherson PS, Campbell KP, Gillette MU (1998) A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 394:381-384.
- 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.
- Dkhissi-Benyahya O, Gronfier C, De Vanssay W, Flamant F, Cooper HM (2007) Modeling the role of mid-wavelength cones in circadian responses to light. *Neuron* 53:677-687.
- Doyle SE, Yoshikawa T, Hillson H, Menaker M (2008) Retinal pathways influence temporal niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13133-13138.
- Dremencov E, Gur E, Lerer B, Newman ME (2003) Effects of chronic

- antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:729-739.
- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG (1999) The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) receptor subunit. *J Biol Chem* 274:30799-30810.
- Dudley TE, Dinardo LA, Glass JD (1998) Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 18:5045-5052.
- Dudley TE, Dinardo LA, Glass JD (1999) In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 81:1469-1477.
- Duncan MJ, Grear KE, Hoskins MA (2004) Aging and SB-269970-A, a selective 5-HT7 receptor antagonist, attenuate circadian phase advances induced by microinjections of serotonergic drugs in the hamster dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1008:40-48.
- Duncan MJ, Hensler JG (2002) Aging alters in a region-specific manner serotonin transporter sites and 5-HT(1A) receptor-G protein interactions in hamster brain. *Neuropharmacology* 43:36-44.
- Duncan MJ, Herron JM, Hill SA (2001) Aging selectively suppresses vasoactive intestinal peptide messenger RNA expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res* 87:196-203.
- Duncan MJ, Jennes L, Jefferson JB, Brownfield MS (2000) Localization of serotonin(5A) receptors in discrete regions of the circadian timing system in the Syrian hamster. *Brain Res* 869:178-185.
- Duncan MJ, Short J, Wheeler DL (1999) Comparison of the effects of aging on 5-HT7 and 5-HT1A receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res* 829:39-45.

E.

- Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A (1984) Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav* 32:357-368.
- Eaton SJ, Eoh S, Meyer J, Hoque S, Harrington ME (1996) Circadian rhythm photic phase shifts are not altered by histamine receptor antagonists. *Brain Res Bull* 41:227-229.
- Ebling FJ (1996) The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* 50:109-132.
- Edelstein K, de la Iglesia HO, Schwartz WJ, Mrosovsky N (2003) Behavioral arousal blocks light-induced phase advances in locomotor rhythmicity but not light-induced *Per1* and *Fos* expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 118:253-261.
- Edgar DM, Miller JD, Prosser RA, Dean RR, Dement WC (1993) Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms* 8:17-31.
- Edgar DM, Reid MS, Dement WC (1997) Serotonergic afferents mediate activity-dependent entrainment of

- the mouse circadian clock. *Am J Physiol* 273:R265-269.
- Ehlen JC, Grossman GH, Glass JD (2001) In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT₇ receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 21:5351-5357.
- Ehlen JC, Novak CM, Karom MC, Gamble KL, Albers HE (2008) Interactions of GABA A receptor activation and light on period mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 23:16-25.
- Ehlen JC, Novak CM, Karom MC, Gamble KL, Paul KN, Albers HE (2006) GABA_A receptor activation suppresses Period 1 mRNA and Period 2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus during the mid-subjective day. *Eur J Neurosci* 23:3328-3336.
- Ellis GB, McKlveen RE, Turek FW (1982) Dark pulses affect the circadian rhythm of activity in hamsters kept in constant light. *Am J Physiol* 242:R44-50.
- Erhardt C, Galani R, Jeltsch H, Cassel JC, Klosen P, Menet JS, Pevet P, Challet E (2004) Modulation of photic resetting in rats by lesions of projections to the suprachiasmatic nuclei expressing p75 neurotrophin receptor. *Eur J Neurosci* 19:1773-1788.
- Eser D, Baghai TC, Moller HJ (2007) Evidence of agomelatine's antidepressant efficacy: the key points. *Int Clin Psychopharmacol* 22 Suppl 2:S15-19.
- 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.
- Flood DG, Gibbs FP (1982) Species difference in circadian [¹⁴C]2-deoxyglucose uptake by suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 232:200-205.
- Foote WE, Taber-Pierce E, Edwards L (1978) Evidence for a retinal projection to the midbrain raphe of the cat. *Brain Res* 156:135-140.
- Freeman DA, Goldman BD (1997) Evidence that the circadian system mediates photoperiodic nonresponsiveness in Siberian hamsters: the effect of running wheel access on photoperiodic responsiveness. *J Biol Rhythms* 12:100-109.
- Fukuhara C, Brewer JM, Dirden JC, Bittman EL, Tosini G, Harrington ME (2001) Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 314:119-122.
- Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R (2004) Activation of presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates glutamatergic synaptic inputs to area postrema neurons in rat brain slices. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26:615-622.

F.

- Feuerstein TJ, Hertting G (1986) Serotonin (5-HT) enhances hippocampal noradrenaline (NA) release: evidence for facilitatory 5-HT receptors within the CNS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 333:191-197.

G.

- Gaillard F, Bonfield S, Gilmour GS, Kuny S, Mema SC, Martin BT, Smale L, Crowder N, Stell WK, Sauve Y (2008) Retinal anatomy and visual performance in a diurnal cone-rich laboratory rodent, the Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Comp Neurol* 510:525-538.

- Gannon RL (2003) Serotonergic serotonin (1A) mixed agonists/antagonists elicit large-magnitude phase shifts in hamster circadian wheel-running rhythms. *Neuroscience* 119:567-576.
- Gannon RL, Millan MJ (2006) Serotonin1A autoreceptor activation by S 15535 enhances circadian activity rhythms in hamsters: evaluation of potential interactions with serotonin2A and serotonin2C receptors. *Neuroscience* 137:287-299.
- Gannon RL, Millan MJ (2007) Evaluation of serotonin, noradrenaline and dopamine reuptake inhibitors on light-induced phase advances in hamster circadian activity rhythms. *Psychopharmacology (Berl)* 195:325-332.
- Gannon RL, Rea MA (1994) In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 23:338-344.
- Garcia-Allegue R, Lax P, Madariaga AM, Madrid JA (1999) Locomotor and feeding activity rhythms in a light-entrained diurnal rodent, *Octodon degus*. *Am J Physiol* 277:R523-531.
- Gardani M, Biello SM (2008) The effects of photic and nonphotic stimuli in the 5-HT7 receptor knockout mouse. *Neuroscience* 152:245-253.
- Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V (2001) In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience* 105:721-729.
- Garidou ML, Gauer F, Vivien-Roels B, Sicard B, Pevet 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.
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schutz G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34:245-253.
- Gauer F, Poirel VJ, Garidou ML, Simonneaux V, Pevet 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.
- Gershon MD, Liu KP, Karpiak SE, Tamir H (1983) Storage of serotonin in vivo as a complex with serotonin-binding protein in central and peripheral serotonergic neurons. *J Neurosci* 3:1901-1911.
- Gibbs FP (1979) Fixed interval feeding does not entrain the circadian pacemaker in blind rats. *Am J Physiol* 236:R249-253.
- Gillespie CF, Huhman KL, Babagbemi TO, Albers HE (1996) Bicuculline increases and muscimol reduces the phase-delaying effects of light and VIP/PHI/GRP in the suprachiasmatic region. *J Biol Rhythms* 11:137-144.
- Gillespie CF, Mintz EM, Marvel CL, Huhman KL, Albers HE (1997) GABA(A) and GABA(B) agonists and antagonists alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the

- suprachiasmatic region. *Brain Res* 759:181-189.
- Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS, Greenberg ME (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260:238-241.
- Glass JD, Selim M, Rea MA (1994) Modulation of light-induced C-Fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT_{1A} receptor agonists. *Brain Res* 638:235-242.
- Goel N, Governale MM, Jechura TJ, Lee TM (2000) Effects of intergeniculate leaflet lesions on circadian rhythms in *Octodon degus*. *Brain Res* 877:306-313.
- Goel N, Lee TM, Smale L (1999) Suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the diurnal rodent *Octodon degus*: retinal projections and immunocytochemical characterization. *Neuroscience* 92:1491-1509.
- Golombek DA, Biello SM, Rendon RA, Harrington ME (1996) Neuropeptide Y phase shifts the circadian clock in vitro via a Y₂ receptor. *Neuroreport* 7:1315-1319.
- Gordon ME, McKeever KH (2005) Diurnal variation of ghrelin, leptin, and adiponectin in Standardbred mares. *J Anim Sci* 83:2365-2371.
- Graff C, Challet E, Pevet P, Wollnik F (2007) 5-HT₃ receptor-mediated photic-like responses of the circadian clock in the rat. *Neuropharmacology* 52:662-671.
- Graff C, Kohler M, Pevet P, Wollnik F (2005) Involvement of the retinohypothalamic tract in the photic-like effects of the serotonin agonist quipazine in the rat. *Neuroscience* 135:273-283.
- Grechez-Cassiau A, Panda S, Lacoche S, Teboul M, Azmi S, Laudet V, Hogenesch JB, Taneja R, Delaunay F (2004) The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J Biol Chem* 279:1141-1150.
- Griffioen HA, Duindam H, Van der Woude TP, Rietveld WJ, Boer GJ (1993) Functional development of fetal suprachiasmatic nucleus grafts in suprachiasmatic nucleus-lesioned rats. *Brain Res Bull* 31:145-160.
- Grima B, Chelot E, Xia R, Rouyer F (2004) Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431:869-873.
- Grossman GH, Farnbauch L, Glass JD (2004) Regulation of serotonin release in the Syrian hamster intergeniculate leaflet region. *Neuroreport* 15:103-106.
- Guido ME, de Guido L, Goguen D, Robertson HA, Rusak B (1999a) Differential effects of glutamatergic blockade on circadian and photic regulation of gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 67:247-257.
- Guido ME, Goguen D, De Guido L, Robertson HA, Rusak B (1999b) Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 90:555-571.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N (2005) Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20:391-403.
- Guler AD, Altimus CM, Ecker JL, Hattar S (2007) Multiple photoreceptors contribute to nonimage-forming visual functions predominantly through melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:509-515.

H.

- Hamaguchi H, Fujimoto K, Kawamoto T, Noshiro M, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Furukawa M, Honma S, Honma K, Kurihara H, Kato Y (2004) Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J* 382:43-50.
- Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 17:2637-2644.
- Hannibal J, Georg B, Hindersson P, Fahrenkrug J (2005) Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci* 27:147-155.
- Harrington ME (1997) The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* 21:705-727.
- Hartenberger JL (2001) Une brève histoire des Mammifères. *Bréviaire de Mammalogie*. (Ed) Paris: Belin, Pour la Science.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.
- Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW (1997) Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* 68:1372-1381.
- Hensler JG (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* 30:203-214.
- Hermes ML, Coderre EM, Buijs RM, Renaud LP (1996) GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol* 496 (Pt 3):749-757.
- Hillegaart V, Hjorth S, Ahlenius S (1990) Effects of 5-HT and 8-OH-DPAT on forebrain monoamine synthesis after local application into the median and dorsal raphe nuclei of the rat. *J Neural Transm Gen Sect* 81:131-145.
- Hiroi T, Hayashi-Kobayashi N, Nagumo S, Ino M, Okawa Y, Aoba A, Matsui H (2001) Identification and characterization of the human serotonin-4 receptor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 289:337-344.
- Hjorth S, Sharp T (1991) Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci* 48:1779-1786.
- 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, Honma K (1999) Light-induced uncoupling of multioscillatory circadian system in a diurnal rodent, Asian chipmunk. *Am J Physiol* 276:R1390-1396.
- 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, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K (2002) *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419:841-844.
- Honma K, von Goetz C, Aschoff J (1983) Effects of restricted daily feeding on freerunning circadian rhythms in rats. *Physiol Behav* 30:905-913.
- Honrado GI, Johnson RS, Golombek DA, Spiegelman BM, Papaioannou VE, Ralph MR (1996) The circadian system of *c-fos* deficient mice. *J Comp Physiol [A]* 178:563-570.
- Horikawa K, Shibata S (2004) Phase-resetting response to (+)8-OH-DPAT, a serotonin 1A/7 receptor agonist, in the mouse in vivo. *Neurosci Lett* 368:130-134.
- Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S (2000) Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced *Per1* and *Per2* mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 20:5867-5873.
- Hou M, Kanje M, Longmore J, Tajti J, Uddman R, Edvinsson L (2001) 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the human trigeminal ganglion: colocalization with calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide synthase. *Brain Res* 909:112-120.
- Hoyer D, Martin G (1997) 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* 36:419-428.
- Huhman KL, Albers HE (1994) Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides* 15:1475-1478.
- Huhman KL, Gillespie CF, Marvel CL, Albers HE (1996) Neuropeptide Y phase shifts circadian rhythms in vivo via a Y2 receptor. *Neuroreport* 7:1249-1252.
- Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU, Dubocovich ML (2001) Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C110-118.
- Hut RA, Mrosovsky N, Daan S (1999) Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms* 14:409-419.

I.

- Ikeda M, Nomura M (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (*BMAL1*) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun* 233:258-264.
- Inagaki N, Honma S, Ono D, Tanahashi Y, Honma K (2007) Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7664-7669.
- Inouye ST, Shibata S (1994) Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res* 20:109-130.
- Ishida Y, Yagita K, Fukuyama T, Nishimura M, Nagano M, Shigeyoshi Y, Yamaguchi S, Komori T, Okamura H (2001) Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iepsilon and Idelta mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 64:612-616.

- Ishikawa J, Kario K, Eguchi K, Morinari M, Hoshida S, Ishikawa S, Shimada K (2006) Regular alcohol drinking is a determinant of masked morning hypertension detected by home blood pressure monitoring in medicated hypertensive patients with well-controlled clinic blood pressure: the Jichi Morning Hypertension Research (J-MORE) study. *Hypertens Res* 29:679-686.
- Ishioka K, Hatai H, Komabayashi K, Soliman MM, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M (2005) Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and re-feeding. *Vet J* 169:85-90.
- Itowi N, Yamatodani A, Mochizuki T, Wada H (1991) Effects of intracerebroventricular histamine injection on circadian activity phase entrainment during rapid illumination changes. *Neurosci Lett* 123:53-56.

J.

- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.
- Jacobs BL, Fornal CA (1999) Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21:9S-15S.
- Jacomy H, Bosler O (1995) Catecholaminergic innervation of the suprachiasmatic nucleus in the adult rat: ultrastructural relationships with neurons containing vasoactive intestinal peptide or vasopressin. *Cell Tissue Res* 280:87-96.
- Jacomy H, Burlet A, Bosler O (1999) Vasoactive intestinal peptide neurons as synaptic targets for vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus. Double-label immunocytochemical

demonstration in the rat. *Neuroscience* 88:859-870.

- Jasper JR, Kosaka A, To ZP, Chang DJ, Eglen RM (1997) Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7b}). *Br J Pharmacol* 122:126-132.
- Jewett ME, Rimmer DW, Duffy JF, Klerman EB, Kronauer RE, Czeisler CA (1997) Human circadian pacemaker is sensitive to light throughout subjective day without evidence of transients. *Am J Physiol* 273:R1800-1809.
- 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.

K.

- Kalen P, Karlson M, Wiklund L (1985) Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[³H]aspartate tracing. *Brain Res* 360:285-297.
- Kalkowski A, Wollnik F (1999) Local effects of the serotonin agonist quipazine on the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroreport* 10:3241-3246.
- Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309:109-118.
- Kalsbeek A, Cutrera RA, Van Heerikhuizen JJ, Van Der Vliet J, Buijs RM (1999) GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 91:453-461.

- Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM (2001) The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142:2677-2685.
- Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM (2000) Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 12:3146-3154.
- 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.
- Kalsbeek A, van Heerikhuizen JJ, Wortel J, Buijs RM (1998) Restricted daytime feeding modifies suprachiasmatic nucleus vasopressin release in rats. *J Biol Rhythms* 13:18-29.
- Kan JP, Chouvet G, Hery F, Debilly G, Mermet A, Glowinski J, Pujol JF (1977) Daily variations of various parameters of serotonin metabolism in the rat brain. I. Circadian variations of tryptophan-5-hydroxylase in the raphe nuclei and the striatum. *Brain Res* 123:125-136.
- Karakas A, Camsari C, Serin E, Gunduz B (2005) Effects of photoperiod and food availability on growth, leptin, sexual maturation and maintenance in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Zoolog Sci* 22:665-670.
- Kario K, Ishikawa J, Pickering TG, Hoshida S, Eguchi K, Morinari M, Hoshida Y, Kuroda T, Shimada K (2006) Morning hypertension: the strongest independent risk factor for stroke in elderly hypertensive patients. *Hypertens Res* 29:581-587.
- Kas MJ, Edgar DM (1999) A nonphotic stimulus inverts the diurnal-nocturnal phase preference in *Octodon degus*. *J Neurosci* 19:328-333.
- Kas MJ, Edgar DM (2000) Photic phase response curve in *Octodon degus*: assessment as a function of activity phase preference. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1385-1389.
- Katona C, Smale L (1997) Wheel-running rhythms in *Arvicanthis niloticus*. *Physiol Behav* 61:365-372.
- Kawahara F, Saito H, Katsuki H (1994) Inhibition by 5-HT₇ receptor stimulation of GABA_A receptor-activated current in cultured rat suprachiasmatic neurones. *J Physiol* 478 (Pt 1):67-73.
- Kawamata T, Omote K, Toriyabe M, Yamamoto H, Namiki A (2003) The activation of 5-HT₃ receptors evokes GABA release in the spinal cord. *Brain Res* 978:250-255.
- Kennaway DJ, Moyer RW (1998) Serotonin 5-HT_{2c} agonists mimic the effect of light pulses on circadian rhythms. *Brain Res* 806:257-270.
- Kennaway DJ, Moyer RW, Voultzios A, Varcoe TJ (2001) Serotonin, excitatory amino acids and the photic control of melatonin rhythms and SCN c-FOS in the rat. *Brain Res* 897:36-43.
- Kennaway DJ, Rowe SA, Ferguson SA (1996) Serotonin agonists mimic the phase shifting effects of light on the melatonin rhythm in rats. *Brain Res* 737:301-307.
- Kielan-Jaworowska Z, Cifelli RL, Luo ZX (2004) Mammals from the Age of Dinosaurs. Origins, Evolution, and Structure. (Eds) 630 p. Columbia University Press.
- Kim DY, Kang HC, Shin HC, Lee KJ, Yoon YW, Han HC, Na HS, Hong

- SK, Kim YI (2001) Substance p plays a critical role in photic resetting of the circadian pacemaker in the rat hypothalamus. *J Neurosci* 21:4026-4031.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89:641-653.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52:307-357; discussion 357-308.
- Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R271-277.
- Kohler M, Kalkowski A, Wollnik F (1999) Serotonin agonist quipazine induces photic-like phase shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 14:131-140.
- Kopp MD, Schomerus C, Dehghani F, Korf HW, Meissl H (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *J Neurosci* 19:206-219.
- Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5:127-134.
- Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS (1992) Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science* 255:1581-1584.
- 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.
- Kroeze WK, Roth BL (1998) The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry* 44:1128-1142.
- 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.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM (1999) A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 11:643-652.
- Lader M (2007) Limitations of current medical treatments for depression: disturbed circadian rhythms as a possible therapeutic target. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:743-755.
- Lahmam M, El M'rabet A, Ouarour A, Pevet P, Challet E, Vuillez P (2008) Daily behavioral rhythmicity and organization of the suprachiasmatic nuclei in the diurnal rodent, *Lemniscomys barbarus*. *Chronobiol Int* 25:882-904.
- Lall GS, Biello SM (2003a) Neuropeptide Y, GABA and circadian phase shifts to photic stimuli. *Neuroscience* 120:915-921.

- Lall GS, Biello SM (2003b) Attenuation of circadian light induced phase advances and delays by neuropeptide Y and a neuropeptide Y Y1/Y5 receptor agonist. *Neuroscience* 119:611-618.
- 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.
- Lambert CM, Weaver DR (2006) Peripheral gene expression rhythms in a diurnal rodent. *J Biol Rhythms* 21:77-79.
- Lanfume Y, Hamon M (2004) 5-HT1 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:1-10.
- Larsen PJ (1999) Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* 46:296-304.
- LaVail MM (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194:1071-1074.
- Lee C, Bae K, Edery I (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* 19:5316-5325.
- Leproult R, Van Onderbergen A, L'Hermite-Baleriaux M, Van Cauter E, Copinschi G (2005) Phase-shifts of 24-h rhythms of hormonal release and body temperature following early evening administration of the melatonin agonist agomelatine in healthy older men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:298-304.
- Levy O, Dayan T, Kronfeld-Schor N (2007) The relationship between the golden spiny mouse circadian system and its diurnal activity: an experimental field enclosures and laboratory study. *Chronobiol Int* 24:599-613.
- Li X, Zhu W, Roh MS, Friedman AB, Rosborough K, Jope RS (2004) In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 29:1426-1431.
- Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW (1998) Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4140-4147.
- 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.
- Liu AC, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Welsh DK, Kay SA (2008) Redundant function of REV-ERBalpha and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genet* 4:e1000023.
- Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U (1997) The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J* 16:6762-6771.
- Loric S, Launay JM, Colas JF, Maroteaux L (1992) New mouse 5-HT2-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. *FEBS Lett* 312:203-207.
- Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland,

brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155:217-219.

Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483-492.

M.

Mahoney M, Bult A, Smale L (2001) Phase response curve and light-induced fos expression in the suprachiasmatic nucleus and adjacent hypothalamus of *Arvicanthis niloticus*. *J Biol Rhythms* 16:149-162.

Mahoney MM, Nunez AA, Smale L (2000) Calbindin and Fos within the suprachiasmatic nucleus and the adjacent hypothalamus of *Arvicanthis niloticus* and *Rattus norvegicus*. *Neuroscience* 99:565-575.

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

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

Malek ZS, Sage D, Pevet P, Raison S (2007) Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology* 148:5165-5172.

Manrique C, Francois-Bellan AM, Segu L, Becquet D, Hery M, Faudon M, Hery F (1994) Impairment of serotonergic transmission is

followed by adaptive changes in 5HT1B binding sites in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 663:93-100.

Marie M, Findlay PA, Thomas L, Adam CL (2001) Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J Endocrinol* 170:277-286.

Masana MI, Sumaya IC, Becker-Andre M, Dubocovich ML (2007) Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the RORbeta knockout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R2357-2367.

Masumoto KH, Nagano M, Takashima N, Hayasaka N, Hiyama H, Matsumoto S, Inouye ST, Shigeyoshi Y (2006) Distinct localization of prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 23:2959-2970.

Matsuda T, Yoshikawa T, Suzuki M, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Nakano Y, Morita T, Nakasu Y, Kim HS, et al. (1995) Novel benzodioxan derivative, 5-(3-(((2S)-1,4-benzodioxan-2-ylmethyl)amino)propoxy)-1,3-benzodioxole HCl (MKC-242), with a highly potent and selective agonist activity at rat central serotonin1A receptors. *Jpn J Pharmacol* 69:357-366.

Matsumoto M, Kimura K, Fujisawa A, Uyama O, Yoneda S, Imaizumi M, Wada H, Abe H (1981) Diurnal variations in monoamine contents in discrete brain regions of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Neurochem* 37:792-794.

Maywood ES, Mrosovsky N (2001) A molecular explanation of interactions between photic and non-photic circadian clock-

- resetting stimuli. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1:27-31.
- Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings MH (1999) Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15211-15216.
- Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH (2003) Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol* 15:329-334.
- Maywood ES, Okamura H, Hastings MH (2002) Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 15:216-220.
- Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, Harmar AJ, Okamura H, Hastings MH (2006) Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol* 16:599-605.
- McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997) Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138:627-634.
- McElhinny TL, Smale L, Holekamp KE (1997) Patterns of body temperature, activity, and reproductive behavior in a tropical murid rodent, *Arvicanthis niloticus*. *Physiol Behav* 62:91-96.
- McGrew L, Chang MS, Sanders-Bush E (2002) Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by Galpha13 and pertussis toxin-insensitive Gbetagamma subunits. *Mol Pharmacol* 62:1339-1343.
- McLennan IS, Lees GJ (1978) Properties and regional distribution of tryptophan hydroxylase in the chicken brain. *J Neurochem* 30:429-436.
- Medanic M, Gillette MU (1992) Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J Physiol* 450:629-642.
- Meijer JH, Schaap J, Watanabe K, Albus H (1997) Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Res* 753:322-327.
- Mendoza J, Revel FG, Pevet P, Challet E (2007) Shedding light on circadian clock resetting by dark exposure: differential effects between diurnal and nocturnal rodents. *Eur J Neurosci* 25:3080-3090.
- Mendoza J, Clesse D, Pevet P, Challet E (2008) Serotonergic potentiation of dark pulse-induced phase-shifting effects at midday in hamsters. *J Neurochem* 106:1404-1414.
- Mendoza JY, Dardente H, Escobar C, Pevet P, Challet E (2004) Dark pulse resetting of the suprachiasmatic clock in Syrian hamsters: behavioral phase-shifts and clock gene expression. *Neuroscience* 127:529-537.
- Meneses A, Perez-Garcia G, Liy-Salmeron G, Flores-Galvez D, Castillo C, Castillo E (2008) The effects of the 5-HT(6) receptor agonist EMD and the 5-HT(7) receptor agonist AS19 on memory formation. *Behav Brain Res* 195:112-119.
- Meng QJ, McMaster A, Beesley S, Lu WQ, Gibbs J, Parks D, Collins J, Farrow S, Donn R, Ray D, Loudon A (2008) Ligand modulation of REV-ERB{alpha} function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner. *J Cell Sci* 121:3629-3635.

- Meyer-Bernstein EL, Blanchard JH, Morin LP (1997) The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus modulates activity phase onset, but not other circadian rhythm parameters. *Brain Res* 755:112-120.
- 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.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP (1998) Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythm phase shifts to triazolam but not to novel wheel access. *J Biol Rhythms* 13:494-505.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP (1999) Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience* 92:267-279.
- Mikkelsen JD, Moller M (1988) Vasoactive intestinal peptide in the hypothalamohypophysial system of the Mongolian gerbil. *J Comp Neurol* 273:87-98.
- Miller JD, Morin LP, Schwartz WJ, Moore RY (1996) New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep* 19:641-667.
- Mintz EM, Jasnow AM, Gillespie CF, Huhman KL, Albers HE (2002) GABA interacts with photic signaling in the suprachiasmatic nucleus to regulate circadian phase shifts. *Neuroscience* 109:773-778.
- Mintz EM, Marvel CL, Gillespie CF, Price KM, Albers HE (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci* 19:5124-5130.
- Miquel MC, Emerit MB, Gingrich JA, Nosjean A, Hamon M, el Mestikawy S (1995) Developmental changes in the differential expression of two serotonin 5-HT₃ receptor splice variants in the rat. *J Neurochem* 65:475-483.
- Mistlberger RE (1991) Effects of daily schedules of forced activity on free-running rhythms in the rat. *J Biol Rhythms* 6:71-80.
- Mistlberger RE (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18:171-195.
- Mistlberger RE, Landry GJ, Marchant EG (1997) Sleep deprivation can attenuate light-induced phase shifts of circadian rhythms in hamsters. *Neurosci Lett* 238:5-8.
- Miyake S, Sumi Y, Yan L, Takekida S, Fukuyama T, Ishida Y, Yamaguchi S, Yagita K, Okamura H (2000) Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 294:41-44.
- Miyamoto Y, Sancar A (1998) Vitamin B₂-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6097-6102.
- Miyamoto Y, Sancar A (1999) Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 71:238-243.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-206.
- Moore RY, Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150:112-116.

- Morales M, Wang SD (2002) Differential composition of 5-hydroxytryptamine₃ receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *J Neurosci* 22:6732-6741.
- Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K (2005) Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J* 24:325-335.
- Morin LP (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* 31:12-33.
- Morin LP, Allen CN (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev* 51:1-60.
- Morin LP, Blanchard J, Moore RY (1992) Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci* 8:219-230.
- Morin LP, Blanchard JH, Provencio I (2003) Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 465:401-416.
- Morin LP, Goodless-Sanchez N, Smale L, Moore RY (1994) Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience* 61:391-410.
- Morin LP, Meyer-Bernstein EL (1999) The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience* 91:81-105.
- Morin LP, Shivers KY, Blanchard JH, Muscat L (2006) Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 137:1285-1297.
- Moriya T, Horikawa K, Akiyama M, Shibata S (2000) Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters. *Mol Pharmacol* 58:1554-1562.
- Mosko SS, Haubrich D, Jacobs BL (1977) Serotonergic afferents to the dorsal raphe nucleus: evidence from HRP and synaptosomal uptake studies. *Brain Res* 119:269-290.
- Mosko SS, Jacobs BL (1977) Electrophysiological evidence against negative neuronal feedback from the forebrain controlling midbrain raphe unit activity. *Brain Res* 119:291-303.
- Moyer RW, Kennaway DJ (1999) Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 271:147-150.
- Mrosovsky N (1991) Double-pulse experiments with nonphotic and photic phase-shifting stimuli. *J Biol Rhythms* 6:167-179.
- Mrosovsky N, Edelman K, Hastings MH, Maywood ES (2001) Cycle of period gene expression in a diurnal mammal (*Spermophilus tridecemlineatus*): implications for nonphotic phase shifting. *J Biol Rhythms* 16:471-478.
- Mueller CR, Maire P, Schibler U (1990) DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell* 61:279-291.
- Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS (1999) Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology* 21:352-367.

Muscat L, Morin LP (2006) Intergeniculate leaflet: contributions to photic and non-photoc responsiveness of the hamster circadian system. *Neuroscience* 140:305-320.

N.

Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M (2001) Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat* 21:63-73.

Nicolau MC, Akaarir M, Gamundi A, Gonzalez J, Rial RV (2000) Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. *Prog Neurobiol* 62:379-406.

Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA (2003) Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 310:101-111.

Novak CM, Albers HE (2002) N-Methyl-D-aspartate microinjected into the suprachiasmatic nucleus mimics the phase-shifting effects of light in the diurnal Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Brain Res* 951:255-263.

Novak CM, Albers HE (2004a) Circadian phase alteration by GABA and light differs in diurnal and nocturnal rodents during the day. *Behav Neurosci* 118:498-504.

Novak CM, Albers HE (2004b) Novel phase-shifting effects of GABA_A receptor activation in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R820-825.

Novak CM, Ehlen JC, Huhman KL, Albers HE (2004) GABA_B receptor activation in the suprachiasmatic nucleus of diurnal and nocturnal

rodents. *Brain Res Bull* 63:531-535.

Novak CM, Ehlen JC, Paul KN, Fukuhara C, Albers HE (2006) Light and GABA_A receptor activation alter period mRNA levels in the SCN of diurnal Nile grass rats. *Eur J Neurosci* 24:2843-2852.

Novak CM, Nunez AA (1998) Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am J Physiol* 275:R1620-1626.

Novak CM, Smale L, Nunez AA (1999) Fos expression in the sleep-active cell group of the ventrolateral preoptic area in the diurnal murid rodent, *Arvicanthis niloticus*. *Brain Res* 818:375-382.

Novak CM, Smale L, Nunez AA (2000) Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthis niloticus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1267-1274.

Nuesslein-Hildesheim B, O'Brien JA, Ebling FJ, Maywood ES, Hastings MH (2000) The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci* 12:2856-2864.

Nunez AA, Bult A, McElhinny TL, Smale L (1999) Daily rhythms of Fos expression in hypothalamic targets of the suprachiasmatic nucleus in diurnal and nocturnal rodents. *J Biol Rhythms* 14:300-306.

O.

Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J, Storm DR (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem* 274:17748-17756.

- Ocampo-Garces A, Hernandez F, Mena W, Palacios AG (2005) Wheel-running and rest activity pattern interaction in two octodontids (*Octodon degus*, *Octodon bridgesi*). *Biol Res* 38:299-305.
- Oishi K, Fukui H, Ishida N (2000) Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 268:164-171.
- Okamura H, Berod A, Julien JF, Geffard M, Kitahama K, Mallet J, Bobillier P (1989) Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci Lett* 102:131-136.
- 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.
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K (2002) Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 309:47-56.
- Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinathsinghji DJ (2000) Localization of 5-HT_{2A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* 867:131-142.
- Onishi H, Yamaguchi S, Yagita K, Ishida Y, Dong X, Kimura H, Jing Z, Ohara H, Okamura H (2002) Rev-erb α gene expression in the mouse brain with special emphasis on its circadian profiles in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 68:551-557.
- Oster H, Baeriswyl S, Van Der Horst GT, Albrecht U (2003a) Loss of circadian rhythmicity in aging mPer1^{-/-}mCry2^{-/-} mutant mice. *Genes Dev* 17:1366-1379.
- Oster H, van der Horst GT, Albrecht U (2003b) Daily variation of clock output gene activation in behaviorally arrhythmic mPer/mCry triple mutant mice. *Chronobiol Int* 20:683-695.
- Oster H, Yasui A, van der Horst GT, Albrecht U (2002) Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes Dev* 16:2633-2638.

P.

- Pal SB (1979) The pattern of urinary excretion of corticosteroids in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endokrinologie* 73:359-362.
- Pauwels PJ (1997) 5-HT_{1B/D} receptor antagonists. *Gen Pharmacol* 29:293-303.
- Penev PD, Zee PC, Turek FW (1997) Serotonin in the spotlight. *Nature* 385:123.
- Perez-Garcia G, Gonzalez-Espinosa C, Meneses A (2006) An mRNA expression analysis of stimulation and blockade of 5-HT₇ receptors during memory consolidation. *Behav Brain Res* 169:83-92.
- Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM (2003) Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 17:221-228.
- Piccione G, Bertolucci C, Foa A, Caola G (2004) Influence of fasting and exercise on the daily rhythm of serum leptin in the horse. *Chronobiol Int* 21:405-417.
- Piccione G, Caola G, Refinetti R (2005) Temporal relationships of 21 physiological variables in horse and

- sheep. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142:389-396.
- Pickard GE, Rea MA (1997) TFMPP, a 5HT1B receptor agonist, inhibits light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 231:95-98.
- Pickard GE, Smith BN, Belenky M, Rea MA, Dudek FE, Sollars PJ (1999) 5-HT1B receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 19:4034-4045.
- Pickard GE, Weber ET, Scott PA, Riberdy AF, Rea MA (1996) 5HT1B receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 16:8208-8220.
- Pickel VM, Chan J (1999) Ultrastructural localization of the serotonin transporter in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 19:7356-7366.
- Piggins HD, Marchant EG, Goguen D, Rusak B (2001a) Phase-shifting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on hamster wheel-running rhythms. *Neurosci Lett* 305:25-28.
- Piggins HD, Rusak B (1997) Effects of microinjections of substance P into the suprachiasmatic nucleus region on hamster wheel-running rhythms. *Brain Res Bull* 42:451-455.
- Piggins HD, Samuels RE, Coogan AN, Cutler DJ (2001b) Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse, and rat. *J Comp Neurol* 438:50-65.
- 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.
- Pittendrigh CS, Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons. *J Comp Physiol* 106:333-355.
- Pohl H (1983) Light pulses entrain the circadian activity rhythm of a diurnal rodent (*Ammospermophilus leucurus*). *Comp Biochem Physiol B* 76:723-729.
- Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F (2003) Contrary to other non-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 120:745-755.
- Poncet L, Denoroy L, Jouvet M (1993) Daily variations in in vivo tryptophan hydroxylation and in the contents of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete brain areas of the rat. *J Neural Transm Gen Sect* 92:137-150.
- Possidente B, Lumia AR, McEldowney S, Rapp M (1992) Fluoxetine shortens circadian period for wheel running activity in mice. *Brain Res Bull* 28:629-631.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-260.
- Prosser RA (1998) Neuropeptide Y blocks serotonergic phase shifts of the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res* 808:31-41.
- Prosser RA (2003) Serotonin phase-shifts the mouse suprachiasmatic

- circadian clock in vitro. *Brain Res* 966:110-115.
- Prosser RA, Dean RR, Edgar DM, Heller HC, Miller JD (1993) Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *J Biol Rhythms* 8:1-16.
- Prosser RA, Gillette MU (1989) The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J Neurosci* 9:1073-1081.
- Prosser RA, Heller HC, Miller JD (1992) Serotonergic phase shifts of the mammalian circadian clock: effects of tetrodotoxin and high Mg²⁺. *Brain Res* 573:336-340.
- Prosser RA, Lee HM, Wehner A (2006) Serotonergic pre-treatments block in vitro serotonergic phase shifts of the mouse suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Neuroscience* 142:547-555.
- Prosser RA, Miller JD, Heller HC (1990) A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res* 534:336-339.
- Q.**
- Quay WB (1968) Differences in circadian rhythms in 5-hydroxytryptamine according to brain region. *Am J Physiol* 215:1448-1453.
- Quintero JE, Kuhlman SJ, McMahon DG (2003) The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J Neurosci* 23:8070-8076.
- R.**
- Racagni G, Riva MA, Popoli M (2007) The interaction between the internal clock and antidepressant efficacy. *Int Clin Psychopharmacol* 22 Suppl 2:S9-S14.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
- Ralph MR, Hurd MW (1995) Circadian pacemakers in vertebrates. *Ciba Found Symp* 183:67-81; discussion 81-67.
- Ralph MR, Mrosovsky N (1992) Behavioral inhibition of circadian responses to light. *J Biol Rhythms* 7:353-359.
- Ramanathan C, Nunez AA, Martinez GS, Schwartz MD, Smale L (2006) Temporal and spatial distribution of immunoreactive PER1 and PER2 proteins in the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region of the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Brain Res* 1073-1074:348-358.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243-1251.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92:179-212.
- Rea MA, Barrera J, Glass JD, Gannon RL (1995) Serotonergic potentiation of photic phase shifts of the circadian activity rhythm. *Neuroreport* 6:1417-1420.
- Rea MA, Glass JD, Colwell CS (1994) Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 14:3635-3642.
- Recio J, Pevet P, Masson-Pevet M (1996) Serotonergic modulation of photically induced increase in melatonin receptor density and Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *J Neuroendocrinol* 8:839-845.
- Redlin U (2001) Neural basis and biological function of masking by

- light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity. *Chronobiol Int* 18:737-758.
- Redlin U, Mrosovsky N (2004) Nocturnal activity in a diurnal rodent (*Arvicanthis niloticus*): the importance of masking. *J Biol Rhythms* 19:58-67.
- Reebs SG, Mrosovsky N (1989) Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve. *J Biol Rhythms* 4:39-48.
- Refinetti R (1995) Body temperature and behaviour of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) in a thermal gradient. *J Comp Physiol [A]* 177:701-705.
- Refinetti R (1996) Comparison of the body temperature rhythms of diurnal and nocturnal rodents. *J Exp Zool* 275:67-70.
- Refinetti R (2006) Variability of diurnality in laboratory rodents. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 192:701-714.
- Refinetti R, Menaker M (1992) The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* 51:613-637.
- Reuss S (1996) Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res* 285:353-378.
- Reuss S, Hurlbut EC, Speh JC, Moore RY (1989) Immunohistochemical evidence for the presence of neuropeptides in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of ground squirrels. *Anat Rec* 225:341-346.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181-194.
- Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* 14:679-689.
- Roberts C, Price GW (2001) Interaction of serotonin autoreceptor antagonists in the rat dorsal raphe nucleus: an in vitro fast cyclic voltammetry study. *Neurosci Lett* 300:45-48.
- Roberts C, Thomas DR, Bate ST, Kew JN (2004) GABAergic modulation of 5-HT₇ receptor-mediated effects on 5-HT efflux in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 46:935-941.
- Roenneberg T, Kuehnele T, Pramstaller PP, Ricken J, Havel M, Guth A, Mrosovsky N (2004) A marker for the end of adolescence. *Curr Biol* 14:R1038-1039.
- 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.
- Rosenwasser AM, Dwyer SM (2001) Circadian phase shifting: Relationships between photic and nonphotic phase-response curves. *Physiol Behav* 73:175-183.
- Rosenwasser AM, Wirz-Justice A (1997). Circadian rhythms and depression: clinical and experimental models. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 125 *Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms* (Redfern PH, Lemmer B, eds). pp 457-486. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Roth BL, Ciaranello RD (1991) Chronic mianserin treatment decreases 5-HT₂ receptor binding without

- altering 5-HT₂ receptor mRNA levels. *Eur J Pharmacol* 207:169-172.
- Rowsemitt CN (1986) Seasonal variations in activity rhythms of male voles: mediation by gonadal hormones. *Physiol Behav* 37:797-803.
- Ruda MA, Coffield J, Steinbusch HW (1982) Immunocytochemical analysis of serotonergic axons in laminae I and II of the lumbar spinal cord of the cat. *J Neurosci* 2:1660-1671.
- Rusak B, Robertson HA, Wisden W, Hunt SP (1990) Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 248:1237-1240.
- S.**
- Sakai K, Salvert D, Touret M, Jouvet M (1977) Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res* 137:11-35.
- San L, Arranz B (2008) Agomelatine: a novel mechanism of antidepressant action involving the melatonergic and the serotonergic system. *Eur Psychiatry* 23:396-402.
- Sanders-Bush E (1990) Adaptive regulation of central serotonin receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharmacology* 3:411-416.
- Sanggaard KM, Hannibal J, Fahrenkrug J (2003) Serotonin inhibits glutamate- but not PACAP-induced per gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Eur J Neurosci* 17:1245-1252.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437:1257-1263.
- Sari Y, Lefevre K, Bancila M, Quignon M, Miquel MC, Langlois X, Hamon M, Verge D (1997) Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT_{1B} receptors in the rat brain. *Brain Res* 760:281-286.
- Sato T, Hara S, Matsui T, Sasaki G, Saijo S, Ganbe T, Tanaka N, Sugano Y, Shoda M (2004a) A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1: heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:149-152.
- Sato T, Kawamura H (1984) Circadian rhythms in multiple unit activity inside and outside the suprachiasmatic nucleus in the diurnal chipmunk (*Eutamias sibiricus*). *Neurosci Res* 1:45-52.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB (2004b) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:527-537.
- Schlag BD, Lou Z, Fennell M, Dunlop J (2004) Ligand dependency of 5-hydroxytryptamine 2C receptor internalization. *J Pharmacol Exp Ther* 310:865-870.
- Schuhler S, Saboureaux M, Pitrosky B, Pevet P (1998) In Syrian hamsters, 5-HT fibres within the suprachiasmatic nuclei are necessary for the expression of 8-OH-DPAT induced phase-advance of locomotor activity rhythm. *Neurosci Lett* 256:33-36.
- Schwartz MD, Nunez AA, Smale L (2004) Differences in the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Neuroscience* 127:13-23.
- Schwartz WJ, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake

- as a functional marker. *Science* 197:1089-1091.
- Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1694-1698.
- Schwartz WJ, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC (1983) In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res* 274:184-187.
- Selim M, Glass JD, Hauser UE, Rea MA (1993) Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 621:181-188.
- Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR (2000a) Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 20:6269-6275.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM (2000b) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288:1013-1019.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19:1261-1269.
- Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 89:387-397.
- Shen H, Semba K (1994) A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res* 635:159-168.
- Shibata S, Tsuneyoshi A, Hamada T, Tominaga K, Watanabe S (1992) Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin_{1A} receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res* 582:353-356.
- Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91:1043-1053.
- Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996a) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-813.
- Silver R, Romero MT, Besmer HR, Leak R, Nunez JM, LeSauter J (1996b) Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced Fos. *Neuroreport* 7:1224-1228.
- Sinclair SV, Mistlberger RE (1997) Scheduled activity reorganizes circadian phase of Syrian hamsters under full and skeleton photoperiods. *Behav Brain Res* 87:127-137.
- Slotten HA, Krekling S, Pevet P (2005) Photic and nonphotic effects on the circadian activity rhythm in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res* 165:91-97.
- Slotten HA, Krekling S, Sicard B, Pevet P (2002) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res* 133:11-19.
- Smale L, Blanchard J, Moore RY, Morin LP (1991) Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Brain Res* 563:77-86.

- Smale L, Boverhof J (1999) The suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet of *Arvicanthis niloticus*, a diurnal murid rodent from East Africa. *J Comp Neurol* 403:190-208.
- Smale L, Michels KM, Moore RY, Morin LP (1990) Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res* 515:9-19.
- Smith BN, Sollars PJ, Dudek FE, Pickard GE (2001) Serotonergic modulation of retinal input to the mouse suprachiasmatic nucleus mediated by 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors. *J Biol Rhythms* 16:25-38.
- Smith RD, Inouye S, Turek FW (1989) Central administration of muscimol phase-shifts the mammalian circadian clock. *J Comp Physiol [A]* 164:805-814.
- Smith VM, Sterniczuk R, Phillips CI, Antle MC (2008) Altered photic and non-photic phase shifts in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuroscience* 157:513-523.
- Sollars PJ, Ogilvie MD, Simpson AM, Pickard GE (2006) Photic entrainment is altered in the 5-HT_{1B} receptor knockout mouse. *J Biol Rhythms* 21:21-32.
- Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1990) Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci* 2:1144-1154.
- Sprouse J, Braselton J, Reynolds L (2006) Fluoxetine modulates the circadian biological clock via phase advances of suprachiasmatic nucleus neuronal firing. *Biol Psychiatry* 60:896-899.
- Sprouse J, Li X, Stock J, McNeish J, Reynolds L (2005) Circadian rhythm phenotype of 5-HT₇ receptor knockout mice: 5-HT and 8-OH-DPAT-induced phase advances of SCN neuronal firing. *J Biol Rhythms* 20:122-131.
- Sprouse J, Reynolds L, Braselton J, Schmidt A (2004) Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT_{5A} receptors? *Synapse* 54:111-118.
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1986) (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT_{1A} selective agonists. *Eur J Pharmacol* 128:295-298.
- Srkalovic G, Selim M, Rea MA, Glass JD (1994) Serotonergic inhibition of extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclear region assessed using in vivo brain microdialysis. *Brain Res* 656:302-308.
- Starke K, Gothert M, Kilbinger H (1989) Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 69:864-989.
- Stein DJ, Ahokas AA, de Bodinat C (2008) Efficacy of agomelatine in generalized anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychopharmacol* 28:561-566.
- Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, Daniel H, Crepel F, Mariani J, Sotelo C, Becker-Andre M (1998) staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3960-3965.
- Stephan 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.
- Sterniczuk R, Stepkowski A, Jones M, Antle MC (2008) Enhancement of

photic shifts with the 5-HT(1A) mixed agonist/antagonist NAN-190: Intra-suprachiasmatic nucleus pathway. *Neuroscience* 153:571-580.

- Sumi Y, Yagita K, Yamaguchi S, Ishida Y, Kuroda Y, Okamura H (2002) Rhythmic expression of ROR beta mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 320:13-16.
- Sumova A, Sladek M, Jac M, Illnerova H (2002) The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res* 947:260-270.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90:1003-1011.

T.

- Takahashi H, Umeda N, Tsutsumi Y, Fukumura R, Ohkaze H, Sujino M, van der Horst G, Yasui A, Inouye ST, Fujimori A, Ohhata T, Araki R, Abe M (2003) Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 110:1-6.
- Takahashi JS, DeCoursey PJ, Bauman L, Menaker M (1984) Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. *Nature* 308:186-188.
- Takahashi S, Yoshinobu Y, Aida R, Shimomura H, Akiyama M, Moriya T, Shibata S (2002) Extended action of MKC-242, a selective 5-HT(1A) receptor agonist, on light-induced Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Neurosci Res* 68:470-478.
- Takahashi Y, Okamura H, Yanaihara N, Hamada S, Fujita S, Ibata Y (1989) Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res* 497:374-377.
- Takano A, Shimizu K, Kani S, Buijs RM, Okada M, Nagai K (2000) Cloning and characterization of rat casein kinase Iepsilon. *FEBS Lett* 477:106-112.
- 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.
- Teclemariam-Mesbah R, Kalsbeek A, Pevet P, Buijs RM (1997) Direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection from the suprachiasmatic nucleus to spinal projecting hypothalamic paraventricular neurons. *Brain Res* 748:71-76.
- Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM (1999) Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 406:171-182.
- Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF, Gillette MU (2003) Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* 278:718-723.
- Tominaga K, Shibata S, Ueki S, Watanabe S (1992) Effects of 5-HT1A receptor agonists on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters. *Eur J Pharmacol* 214:79-84.
- Tong Y, Guo H, Brewer JM, Lee H, Lehman MN, Bittman EL (2004) Expression of haPer1 and haBmal1

in Syrian hamsters: heterogeneity of transcripts and oscillations in the periphery. *J Biol Rhythms* 19:113-125.

- Tournier BB, Dardente H, Vuillez P, Pevet P, Challet E (2007) Expression of Tg α in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Neuroscience* 145:1138-1143.
- Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pevet M, Pevet P, Vuillez P (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118:317-322.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7728-7733.
- Trulson ME, Jacobs BL (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* 163:135-150.
- Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175:157-161.

U.

- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418:534-539.
- Uhl GR, Reppert SM (1986) Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232:390-393.

V.

- Van den Pol AN (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191:661-702.
- Van den Pol AN (1991) The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. In: *Suprachiasmatic nucleus: The Mind's clock* (Klein DC, Moore RY et al., eds), Ed 1, pp 17-50. New York: Oxford University Press.
- 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.
- van der Veen DR, Mulder EG, Oster H, Gerkema MP, Hut RA (2008) SCN-AVP release of mPer1/mPer2 double-mutant mice in vitro. *J Circadian Rhythms* 6:5.
- van Esseveldt KE, Lehman MN, Boer GJ (2000) The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev* 33:34-77.
- Van Reeth O, Sturis J, Byrne MM, Blackman JD, L'Hermite-Baleriaux M, Leproult R, Oliner C, Refetoff S, Turek FW, Van Cauter E (1994) Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. *Am J Physiol* 266:E964-974.
- Varcoe TJ, Kennaway DJ (2008) Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces Per1 gene expression in the rat SCN in vitro. *Brain Res* 1209:19-28.

- Varcoe TJ, Kennaway DJ, Voultzios A (2003) Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces Per gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Brain Res Mol Brain Res* 119:192-200.
- Verhagen LA, Pevet P, Saboureau M, Sicard B, Nesme B, Claustrat B, Buijs RM, Kalsbeek A (2004) Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Res* 995:197-204.
- Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol* 20:4888-4899.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.
- Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12114-12119.
- Vivanco P, Ortiz V, Rol MA, Madrid JA (2007) Looking for the keys to diurnality downstream from the circadian clock: role of melatonin in a dual-phasing rodent, *Octodon degus*. *J Pineal Res* 42:280-290.
- 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.
- Vuillez P, Jacob N, Teclemariam-Mesbah R, Van Rossum A, Vivien-Roels B, Pevet P (1998) Effect of NMDA receptor antagonist MK-801 on light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nuclei and on melatonin production in the Syrian hamster. *J Neuroendocrinol* 10:671-677.

W.

- Wachulec M, Li H, Tanaka H, Peloso E, Satinoff E (1997) Suprachiasmatic nuclei lesions do not eliminate homeostatic thermoregulatory responses in rats. *J Biol Rhythms* 12:226-234.
- Wakamatsu H, Takahashi S, Moriya T, Inouye ST, Okamura H, Akiyama M, Shibata S (2001) Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* 12:127-131.
- Watts AG, Swanson LW (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol* 258:230-252.
- Weber ET, Gannon RL, Rea MA (1998) Local administration of serotonin agonists blocks light-induced phase advances of the circadian activity rhythm in the hamster. *J Biol Rhythms* 13:209-218.
- Weber ET, Rea MA (1997) Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. *Neurosci Lett* 231:159-162.
- Weinert D, Waterhouse J (1998) Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in

- laboratory mice. *Physiol Behav* 63:837-843.
- Weinert D, Weinandy R, Gattermann R (2007) Photic and non-photic effects on the daily activity pattern of Mongolian gerbils. *Physiol Behav* 90:325-333.
- Weiss S, Sebben M, Kemp DE, Bockaert J (1986) Serotonin 5-HT₁ receptors mediate inhibition of cyclic AMP production in neurons. *Eur J Pharmacol* 120:227-230.
- 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.
- Wollnik F (1992) Effects of chronic administration and withdrawal of antidepressant agents on circadian activity rhythms in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 43:549-561.
- Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M, Schlingensiefen KH, Herdegen T (1995) Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 7:388-393.
- Wong DT, Perry KW, Bymaster FP (2005) Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov* 4:764-774.
- Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM, Jennes L (1995) Comparative localization of serotonin_{1A}, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol* 351:357-373.
- 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, Silver R (2002) Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci* 16:1531-1540.
- 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.
- Yannielli PC, Harrington ME (2001a) The neuropeptide Y Y5 receptor mediates the blockade of "photic-like" NMDA-induced phase shifts in the golden hamster. *J Neurosci* 21:5367-5373.
- Yannielli PC, Harrington ME (2001b) Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22:547-556.
- Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA (2006) Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 311:1002-1005.
- Ying SW, Rusak B (1994) Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 651:37-46.
- Ying SW, Rusak B (1997) 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* 755:246-254.
- Yokota S, Moriya T, Shibata S (2005) Inhibitory action of 5-HT_{1A} agonist MKC-242 on triazolam-induced phase advances in hamster circadian activity rhythms. *J Pharmacol Sci* 98:103-106.
- Yokota SI, Horikawa K, Akiyama M, Moriya T, Ebihara S, Komuro G, Ohta T, Shibata S (2000) Inhibitory

Y.

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

action of brotizolam on circadian and light-induced *per1* and *per2* expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol* 131:1739-1747.

Yuan Q, Lin F, Zheng X, Sehgal A (2005) Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron* 47:115-127.

Z.

Zatz M, Herkenham MA (1981) Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel-running activity. *Brain Res* 212:234-238.

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.

Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A (1999) The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400:169-173.

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

Zolovick A, Upson DW, Eleftheriou BE (1966) Diurnal variation in plasma gluco-corticosteroid levels in the horse (*Equus caballus*). *J Endocrinol* 35:249-253.

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.

APPENDIX

